Postverlagsort Berlin

ZEITSCHRIFT FÜR ZELLFORSCHUNG UND MIKROSKOPISCHE ANATOMIE

HERAUSGEGEBEN UND REDIGIERT VON

W. BARGMANN
KIEL

B. SCHARRER
NEW YORK

J. SEILER
ZÜRICH

54. BAND, 4. HEFT

MIT 60 TEXTABBILDUNGEN IN 106 EINZELDARSTELLUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 4. JULI 1961)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1961

Z. Zellforsch.

Preis DM 39.80

Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie

Begründet 1924 unter dem Titel: Zeitschrift für Zellen- und Gewebelehre. Redigiert von *R. Goldschmidt* und *W. von Möllendorff*. Bd. 2—28 (1938). Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie. (Bd. 1—20), 1934 als: Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie Abteilung B) herausgegeben von *R. Goldschmidt, W. von Möllendorff, H. Bauer, J. Seiler*. Bd. 29—33 (1944) Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie Abteilung A. Allgemeine Zellforschung und mikroskopische Anatomie. Herausgegeben und redigiert von *W. von Möllendorff* und *J. Seiler*, Berlin, Springer. Bd. 34—35 (1948—1950) Springer, Wien, ab Bd. 36 Springer, Berlin, ab Bd. 34 ohne den Untertitel Abteilung A, Allgemeine Zellforschung usw.

Ab Bd. 2 (1925) mit dem Untertitel: Fortsetzung des SCHULTZE-WALDEYER-HERTWIGschen Archivs für mikroskopische Anatomie. [Dieses wurde begründet 1864. Bd. 1—13 (1876) herausgegeben von *Max Schultze*; Bd. 13, Heft 4, bis Bd. 35 (1890) herausgegeben von *v. La Valette St. George, W. Waldeyer*; Bd. 36—43 (1894) herausgegeben von *O. Hertwig, v. La Valette St. George, W. Waldeyer*. Ab Bd. 44 als Archiv f. mikroskopische Anatomie und Entwicklungsgeschichte, ab Bd. 77—95 (1910—1922) in 2 Abteilungen. Bd. 1—95, Bonn, Cohen. Ab Bd. 96 Berlin, Springer. Fortsetzung Bd. 98—104 (1923—1925) Archiv für mikroskopische Anatomie und Entwicklungsmechanik. Herausgegeben von *W. Roux, H. Braus, H. Spemann*.]

Die Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie steht Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der beschreibenden und experimentellen Zellen- und Gewebelehre sowie dem Gebiet der mikroskopischen Anatomie des Menschen und der Tiere offen, wobei Arbeiten mit funktionellem und experimentellem Inhalt bevorzugt werden.

Arbeiten karyologischen Inhalts werden an die Zeitschrift „Chromosoma", Arbeiten zur histochemischen und histophysikalischen Grundlagenforschung, insbesondere ihrer Methodik, an die Abteilung „Histochemie" weitergeleitet.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung rascher Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Alle Manuskripte sind zu senden und Anfragen zu richten an:

Prof. Dr. W. Bargmann, Kiel, Anatomisches Institut der Universität, Neue Universität, Eingang F 1,

Prof. Dr. Berta Scharrer, Albert Einstein College of Medicine, Dept. of Anatomy, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, N.Y., USA,

Prof. Dr. J. Seiler, Zürich 6, Sonneggstr. 45.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301, Fernschreibnummer 01-83319
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901, Fernschreibnummer 04-61723

54. Band **Inhaltsverzeichnis** 4. Heft

Seite

OTREMBA, P., Beobachtungen an neurosekretorischen Zellen des Regenwurmes *(Lumbricus spec.)*. Mit 10 Textabbildungen 421

ZWILLENBERG, L. O., Histochemische Beobachtungen am Saccus vasculosus der Forelle. Mit 2 Textabbildungen 437

KITZING, W., und H. H. SCHUMACHER, Ontogenese und topographische Histochemie der Bernsteinsäuredehydrogenase in der Leber einiger Nager. Untersuchungen zur funktionellen Gliederung des Leberparenchyms. Mit 19 Textabbildungen 443

MÜLLER-MOHNSSEN, H., Strukturveränderungen des Ranvierschen Schnürrings während des Elektrotonus und während der funktionellen Zerstörung. Mit 9 Textabbildungen in 83 Einzeldarstellungen 468

FJERDINGSTAD, E. J., Ultrastructure of the collar of the choanoflagellate *Codonosiga botrytis* (EHRENB.). With 8 Figures in the Text 499

ENGEL, H.-J., u. E. ZERBST, Über die Degeneration der Leukozyten in vitro. (Untersuchungen mit dem Phasenkontrastmikroskop.) Mit 4 Textabbildungen in 23 Einzeldarstellungen 511

SCHARRER, E., and S. BROWN, Neurosecretion. XII. The formation of neurosecretory granules in the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. With 5 Figures in the Text . . . 530

BARGMANN, W., und A. KNOOP, Elektronenmikroskopische Untersuchungen an der Reptilien- und Vogellunge. Mit 3 Textabbildungen 541

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Zeitschrift für Zellforschung 54, 421—436 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Bargmann)

BEOBACHTUNGEN AN NEUROSEKRETORISCHEN ZELLEN DES REGENWURMES *(LUMBRICUS SPEC.)*

Von

Peter Otremba

Mit 10 Textabbildungen

(Eingegangen am 1. Oktober 1960)

Inhalt

Seite

A. Einleitung und Fragestellung 421
B. Material und Methodik 423
C. Befunde 423
I. Allgemeine Bemerkungen zur Morphologie der neurosekretorischen Zellen von *Lumbricus spec.* 423
1. Cerebralganglion S. 423. — a) Chromalaunhämatoxylin-Phloxin S. 423. — b) Pseudoisocyanin S. 427. — c) Aldehydfuchsin S. 427. — d) Sudanschwarz S. 427. — e) Massonfärbung in der Modifikation (Foot, Gomori) S. 428. — f) Silberimprägnationen S. 428.
2. Schlundkonnektive S. 428. — a) Chromalaunhämatoxylin-Phloxin S. 428. b) Pseudoisocyanin S. 428. — c) Aldehydfuchsin, Sudanschwarz S. 429.
3. Unterschlundganglion S. 429. — a) Chromalaunhämatoxylin-Phloxin S. 429. — b) Massonfärbung in der Modifikation Gomori II S. 429. — c) Aldehydfuchsin S. 430.
4. Bauchmark S. 430. — a) Sudanschwarz S. 430. — b) Silberimprägnationen S. 430.
II. Histochemische Reaktionen 430
III. Der Komplex nach H. Hubl 430
IV. Veränderungen der neurosekretorischen Zellen unter verschiedenen Umweltsbedingungen 432
D. Diskussion 433
Zusammenfassung 434
Literatur 435

A. Einleitung und Fragestellung

Wie bei anderen Wirbellosen wurden auch bei Lumbriciden neurosekretorische Ganglienzellen nachgewiesen. E. und B. Scharrer (1937) sowie B. Scharrer (1937) berichten über Drüsen-Nerven-Zellen im dorsalen und kaudalen Bezirk des Cerebralganglions und in den vorderen Ventralganglien. Die Autoren unterscheiden nach Färbung mit Eosin-Lichtgrün grünlich gefärbte nichtneurosekretorische a-Zellen, zum Teil sich rot tönende granulierte b-Zellen und grünlichviolett gekörnte c-Zellen. Im Cerebralorgan von *Lycastis*-Arten findet J. W. Harms (1947—1949) bei Azanfärbung intensiv homogen rot hervortretende a-Zellen, die peripherer und verstreut liegenden Scharrerschen b-Zellen und die medial von den a-Zellen gelegenen, fein granulierten, bläulichen bis blauvioletten c- und d-Zellen, die alle auch bei Lumbriciden vorkommen. Die c- und d-Zellen bilden Vakuolen, die sich mit Kolloid füllen, größer werden und schließlich die ganze

Zelle einnehmen. H. HUBL (1951, 1953, 1956) unterscheidet nach Färbung mit Toluidinblau gleichfalls die Harmsschen a- und Scharrerschen b-Zellen, denen er als 3. Gruppe die nichtneurosekretorischen Ganglienzellen mit vielen kleinen Vakuolen und sehr starker Basophilie des Cytoplasmas zur Seite stellt. H. HUBL (1956) berichtet ferner über eine Verschmelzung der b-Zellen zum sog. Komplex, der nur bei verletzten Tieren gefunden wird, und unterscheidet die den b-Zellen färberisch ähnlichen, jedoch größeren, nicht komplexbildenden c-Zellen. Bei amputierten Tieren findet er im Unterschlundganglion mit der Paraldehydmethode von CLARK (1955) u-Zellen, die mit dichten, kleinen, tief blauviolett angefärbten Granula gefüllt sind. Er schreibt ihnen eine Beziehung zur Regeneration zu.

Im Gegensatz zu den genannten Autoren vermutet J. BRANDENBURG (1956), es handele sich bei den Zelltypen möglicherweise um verschiedene Stadien eines *Sekretionszyklus*. Auf Grund ihrer Anfärbbarkeit mit Paraldehydfuchsin unterscheidet BRANDENBURG 6 verschiedene Zellformen: 1. Elemente mit teilweise rosarotem, teilweise blaugrau gefärbtem Cytoplasma; 2. einheitlich rosarot bis hellviolett gefärbte Zellen; 3. Zellen mit locker verteilten, rot gefärbten Schollen; 4. an Tropfen und Schollen reiche Zellen; 5. Elemente mit wenigen tropfigen, tiefrot gefärbten Granula in blaugrauem Cytoplasma; 6. völlig mit tiefroten bis tiefvioletten Tropfen gefüllte Zellen.

Einen jahreszeitlichen Sekretionszyklus fand H. HUBL (1953, 1956) bei den a-Zellen. Die Intensität der Anfärbbarkeit dieser Zellen nimmt im Frühjahr ab. Im Winter zeigen sie einen geschrumpften Kern und wenig Cytoplasma. In Regenerationsversuchen findet H. HUBL das gleiche Phänomen bei den c-Zellen. Ferner beobachtet der Autor die Auflösung des homogenen Cytoplasmas der a-Zellen in kleine Tröpfchen. Die Abgabe des Neurosekrets entlang den Axonen wurde von HERLANT-MEEWIS (1955) im Cerebralganglion nachgewiesen. Nach den Angaben der Autorin (HERLANT-MEEWIS 1956) zeigen die a-Zellen ein je nach Lebensalter und physiologischem Zustand des Wurmes recht verschiedenes Aussehen; ihre Veränderungen stehen nach ihrer Auffassung zu den Wachstumsvorgängen in Beziehungen. Die b-Zellen sollen kaum Wandlungen ihrer Struktur unterliegen.

Die Vielfalt der Beschreibungen verschiedener Erscheinungsformen der Nervenzellen der Lumbriciden läßt es zunächst als wünschenswert erscheinen, die Angaben der Autoren miteinander und mit Resultaten eigener Untersuchungen zu vergleichen.

Bei dieser Gelegenheit wurde auch geprüft, ob sich den bisher angewandten Färbemethoden zur Darstellung neurosekretorischer Zellen bei Wirbellosen ein weiteres Verfahren hinzufügen läßt. Die von W. BARGMANN (1949) zur Darstellung neurosekretorischer Zellen herangezogene Chromalaunhämatoxylin-Phloxinfärbung GOMORIS, ursprünglich zur elektiven Färbung der B-Zellen im Inselapparat bestimmt, hat sich als brauchbares Verfahren zur Darstellung neurosekretorischer Zellen auch bei Wirbellosen erwiesen. Man konnte daher vermuten, daß auch die von SCHIEBLER (1958) mitgeteilte Methode zur Färbung der B-Zellgranula und des Neurosekretes von Wirbeltieren für die Hervorhebung von Neurosekret bei Wirbellosen — im vorliegenden Falle bei Lumbriciden — von Nutzen sei.

Aus diesem Grunde versuchte ich, die neurosekretorischen Ganglienzellen dieser Wirbellosen mit *Pseudoisocyanin* darzustellen.

Die Angaben von Brandenburg und Hubl legen die Frage nahe, ob Veränderungen des färberischen und morphologischen Verhaltens der neurosekretorischen Zellen von Lumbricus im Wechsel der Umweltsbedingungen auch unabhängig von den Jahreszeiten und bei unverletzten Tieren auftreten, etwa bei Haltung der Tiere in trockenem Milieu.

B. Material und Methodik

Das Cerebralganglion, die Schlundkonnektive, das Unterschlundganglion und das Bauchmark der ersten 13 Segmente großer Exemplare von *Lumbricus (spec.)* wurden untersucht. Meistens wurden das Cerebralganglion und andere Abschnitte des Nervensystems nach Alkohol-Narkose (8—10%ig, 2 min) herauspräpariert.

Fixation: Bouinsches Gemisch, neutrales Formol 10%, Susa. — Einbettung: Celloidin, Paraffin. — Gefrierschnitte, Herstellung von Schnittserien 4—6 μ. — Färbungen: Aldehydfuchsin, Azan (M. Heidenhain), Chromalaunhämatoxylin-Phloxin (Bargmann 1949), Massonsche Trichromfärbung nach Foot (1933) und Gomori (1950) = Gomori II, Hämatoxylin-Eosin, Pseudoisocyanin (Schiebler 1958), Sudanschwarz, Silberimprägnationen: Bielschowsky-Maresch-Sano (Bindegewebe), Bodian-Ziesmer. — Histochemische Reaktionen: Acetylcholin-Reaktion (M. A. Gerebtzoff 1953) in Modifikation des Verfahrens von Koelle Fixation 8 Std., p_H-Werte 6,2 und 6,8; Reaktionsdauer 5—120 min), Bernsteinsäuredehydrogenase-Reaktion, Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PJS).

Experimente: Von August bis 31. Januar 1957/58 wurden rund 40 Regenwürmer in Gartenerde bei normaler Feuchtigkeit und Temperaturen von 18—20° C gehalten. Je die gleiche Zahl Würmer (6) wurden vom 31. 1. 58 bis zum 28. 2. 58 bei gleicher Temperatur unter verschiedenen Umweltsbedingungen gehalten: A-Würmer in nasser, schlammiger Erde; B-Würmer in 5 cm tiefer Erdschicht, Trocknung, C-Würmer in Gartenerde von sehr geringer Feuchtigkeit, Dunkelheit; D-Würmer in feuchter, schlammiger Erde, in Dunkelheit; E-Würmer in flacher Erdschicht bei etwa —10° C.

Andere Tiere wurden zu verschiedenen Zeiten des Jahres gesammelt und sofort präpariert: F-Würmer am 3. 4. 58, G-Würmer am 26. 5. 58; H-Würmer am 3. 8. 58.

C. Befunde

I. Allgemeine Bemerkungen zur Morphologie der neurosekretorischen Zellen von Lumbricus (spec.)

1. Cerebralganglion. *a) Chromalaunhämatoxylin-Phloxin.* Auf Querschnitten durch das Cerebralganglion von *Lumbricus* erkennt man nach Färbung mit Chromalaunhämatoxylin-Phloxin Nervenzellen verschiedenen färberischen Verhaltens unmittelbar unter der Oberfläche , die sich in vivo durch eine bläuliche Färbung auszeichnet (vgl. H. Hubl 1953). Besonders viele Nervenzellen finden sich im dorsalen und lateralen Bereich des Cerebralganglions. Im Zentrum des Ganglions lassen sich nur Nervenfasern darstellen. Zahlreiche Blutkapillaren dringen in die periphere Zone des Cerebralganglions ein; sie entstammen einem Gefäßgeflecht (H. Hubl 1953) in der das Ganglion umgebenden Kapsel.

Man kann vier verschiedene Zellformen unterscheiden, deren Durchmesser von 10—30 μ schwankt. Ein Teil der Zellen (Gruppe 1—3), nämlich die kleinen, unregelmäßig rundlich gestalteten bzw. birnenförmigen Elemente, besitzt ein homogen erscheinendes blau-schwarzes Cytoplasma. Der Eindruck der Homogenität entsteht durch die Verschmelzung von Granula. Vakuolen werden selten beobachtet. Der kugelige, randständige, sehr oft nahe der Abgangsstelle eines

Zellfortsatzes gelegene Kern wird infolge deutlicher Anfärbung der Kernmembran scharf vom Cytoplasma geschieden. Die vereinzelt oder in Mehrzahl

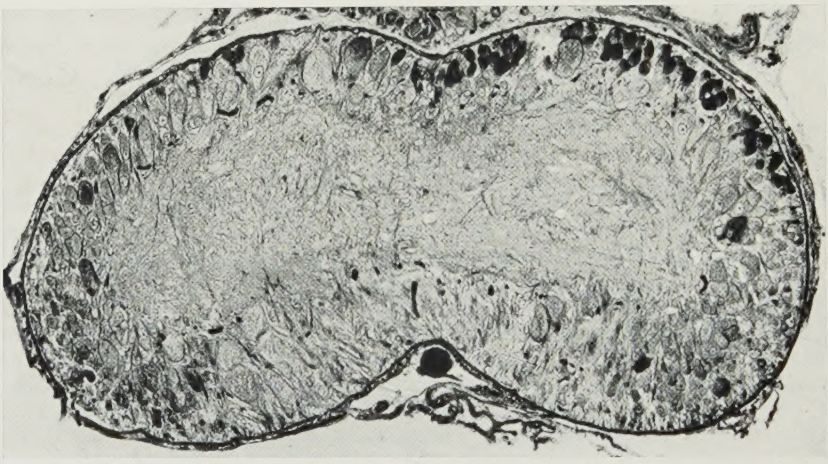


Abb. 1. Querschnitt durch das Cerebralganglion von *Lumbricus spec.* (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 160fach)

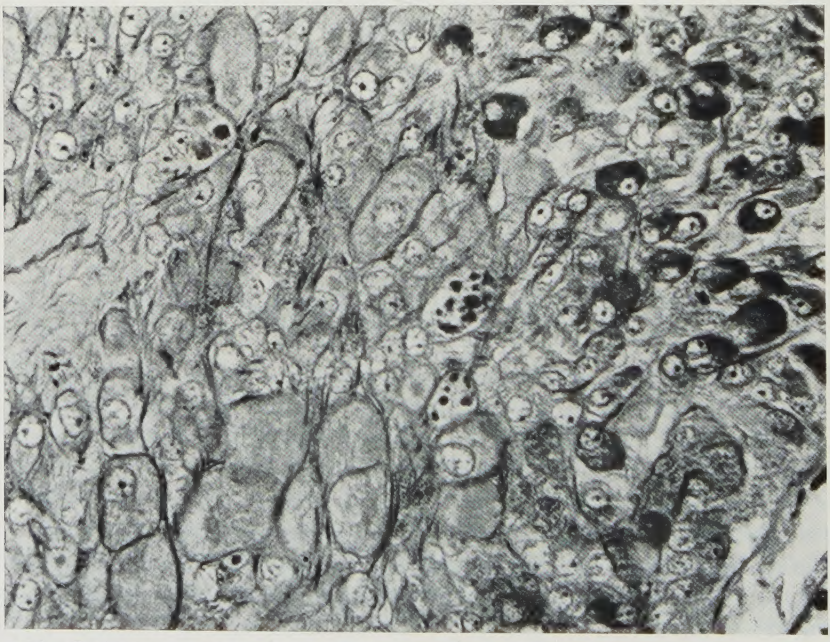


Abb. 2. Verschiedene neurosekretorische Zellgruppen (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 510fach)

vorhandenen Kernkörperchen färben sich ebenfalls deutlich rot. Auf Schnittserien tritt die Anhäufung dieser Zellen zu Gruppen erkennbar hervor. Nur selten sieht man sie vereinzelt inmitten anderer Zellformen innerhalb des Cerebralganglions.

In Gruppen tritt auch die *2. Zellart* auf, die sich in ihrer Größe nicht von den geschilderten unterscheidet. Sie kommt besonders dort vor, wo keine oder wenige Exemplare der eben beschriebenen 1. Zellart lagern. Das Cytoplasma dieses 2. Zelltyps ist teils frei von Granula, teils besitzt es eine feine blaugraue Körnelung, die ungleichmäßig im Zelleib verteilt ist. In körnchenfreien Zellbezirken erkennt man ein wabiges, schollig aufgelockertes Cytoplasma. Der rundliche, pralle Kern auch dieser Zellen liegt häufig nahe der Abgangsstelle des Axons. Selten sieht man Nucleolen mit Radspeichenstruktur, wie sie Sano (1958) für Neurosekretzellen von *Tinca vulgaris* beschreibt. Einige dieser Zellen enthalten tropfige Sekreteinschlüsse und optisch leere Vakuolen. In anderen Zellen erscheint das Cytoplasma fädig strukturiert. Der Kern der Zellen mit fädigem Cytoplasma unterscheidet sich nicht von demjenigen anderer Zellen. Eine Ent-

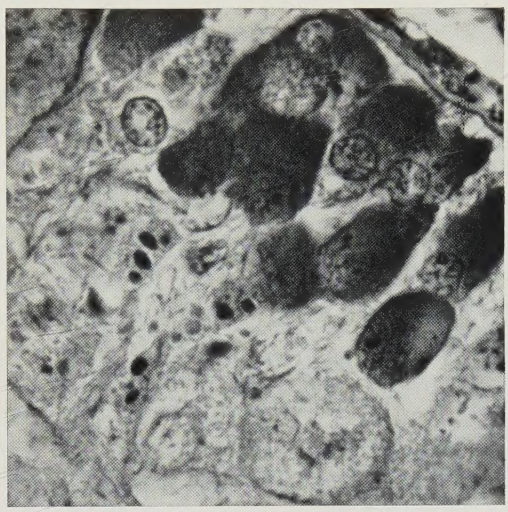


Abb. 3. Zellen der Gruppe 1 mit Sekrettröpfchen im Axon (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 1080fach)

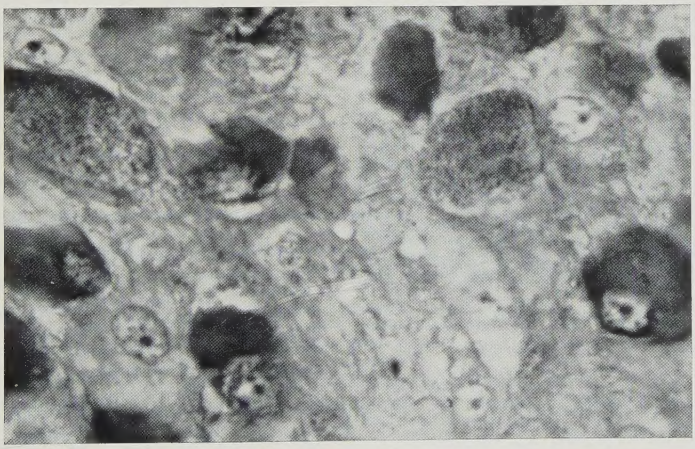


Abb. 4. Zellen der Gruppe 1 und 2 mit Zwischenstufen (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 1080fach)

rundung oder Schrumpfung des Kernes, dessen Membran und Nucleolen sich nunmehr bläulich tingieren, beobachtet man nicht selten.

Die *3. Gruppe* unterscheidet sich von den bisher beschriebenen nur hinsichtlich der Anfärbbarkeit des Cytoplasmas. Es erscheint nach Behandlung mit Chromalaunhämatoxylin-Phloxin homogen rot. Selten beobachtet man eine schollige oder körnige Struktur des Zelleibes.

Die geschilderten Zelltypen scheinen durch Übergangsformen miteinander verbunden zu sein. Man findet nämlich nebeneinander rot, rot-violett, blau-violett, blau-grau und schwarz-blau gefärbte Zellen. Auch können innerhalb einer Zelle Zonen verschiedener Färbbarkeit auftreten. Gelegentlich heben sich unterschiedlich gefärbte Cytoplasmabezirke mit scharfer Begrenzung voneinander ab. Ferner kann man in ein und derselben Zelle homogene und granulierte Partien nebeneinander feststellen, letztere vorzugsweise in der Umgebung des Zellkerns. Man kann zwar die im Cytoplasma liegenden Granula in die Abgangsstellen der Axone hinein verfolgen (vgl. HERLANT-MEEWIS 1955). Es ist jedoch nicht gelungen, längere Strecken grob granulierter Nervenzellfortsätze darzustellen. Noch seltener beobachtet man phloxinophile Einschlüsse in Form deutlich großer Tropfen in den Axonen. Man erkennt häufig an den granulahaltigen Fasern zentrale Aufhellungen; das mit Chromalaunhämatoxylin-Phloxin färbbare Material nimmt die Peripherie der Axone ein. Ein Teil der übrigen Fasern zeigt phloxinophile Auftreibungen. Auf Faserquerschnitten lassen sich teilweise intraaxonale phloxinophile feine Tröpfchen erkennen.

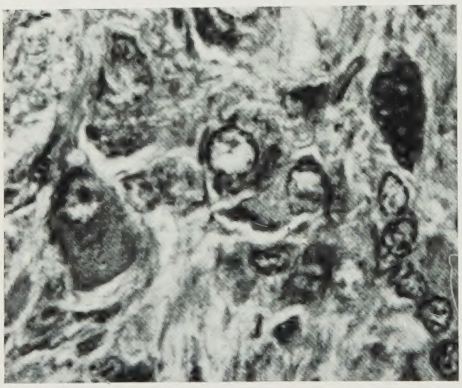


Abb. 5. Feingranulierte phloxinophile Zelle der Gruppe 3 in der Nähe einer kleinen, intensiv gefärbten Zelle der Gruppe 1 mit deutlicher Körnelung (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 940fach)

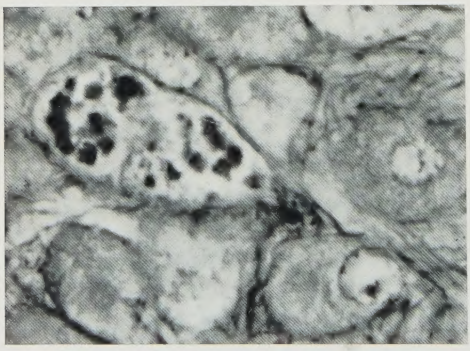


Abb. 6. Große Zelle mit phloxinophilem Sekret (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 1080fach)

Eine auffallend große, überwiegend länglich ovale Zellform gehört der *4. Gruppe* an. Ihre Elemente sind nicht so dunkel gefärbt wie die bisher geschilderten Zellen, ihr Cytoplasma ist wabig, schwammig oder körnig strukturiert. Vakuolen treten in wechselnder Zahl auf; manche Zellen erscheinen weitgehend optisch leer. Ferner werden Siegelringformen, wie sie EICHNER (1951) im Nebennierenmark von Goldhamstern findet, beobachtet. Es scheint sich um unipolare Ganglienzellen zu handeln. Der in der Regel pralle, meistens nahe der Abgangsstelle des Axons gelegene Zellkern besitzt häufig randständige, kleine Kernkörperchen und einen mittelständigen großen, phloxinophilen Nucleolus. Ein Kernkörperchen mit Radspeichenstruktur läßt sich gleichfalls nachweisen. Die Zahl der Kernkörperchen schwankt erheblich. Eine Besonderheit gegenüber den beschriebenen Gruppen 1—3 stellt die bei manchen Zellen anzutreffende Verdickung der rötlich gefärbten Zelloberfläche dar, die besonders am Ursprung eines Ausläufers ausgeprägt ist. Im Axon gelegene deutliche Granula sind äußerst selten.

Die Anfärbbarkeit der Elemente dieser 4. Gruppe ist nicht einheitlich. Es finden sich alle Übergänge zwischen Zellen mit stark rot färbbarem Cytoplasma und Elementen mit schwarzblau getönter Granulation; letztere erscheint jedoch stets lockerer als bei den Gruppen 1—3. Die Zellen mit phloxinophilem, zartkörnigem Cytoplasma zeichnen sich in der Regel durch zahlreiche Kernkörperchen und Radspeichenstruktur der Nucleolen aus. Auffällig ist, daß Perikaryen, die volumenmäßig zwischen den ersten drei Gruppen und der letzten beschriebenen stehen, sich in überwiegender Zahl etwas intensiver als die großen anfärben. Ihr Kern zeichnet sich durch blau-violette statt rötliche Tönung aus. Die übrigen dieser Formen besitzen ein phloxinophiles Cytoplasma mit fädiger Struktur.

Vereinzelt begegnet man *zugrunde gehenden Zellen mit vakuolisiertem Zellkern* und rissig erscheinendem Zelleib, der Vakuolen verschiedener Größe und insbesondere rotviolett tingierte Einschlüsse enthält.

Auf Grund der bisher vorliegenden morphologischen Erfahrungen liegt es nahe, die mit Chromalaunhämatoxylin färbbare sowie die phloxinophilen Substanzen als Produkte einer sekretorischen Tätigkeit der Neurone anzusprechen.

b) Pseudoisocyanin. Bei Anwendung der Pseudoisocyaninfärbung (Schiebler 1958) treten die Nervenzellen im Cerebralganglion unterschiedlich stark rot getönt hervor. Der Kern aller Zellen ist ungefärbt, ausgenommen die Kernkörperchen. Besonders gut ist die beschriebene Radspeichenstruktur des Zellkerninhaltes zu erkennen.

Im einzelnen verhalten sich die oben beschriebenen Zellformen wie folgt: Die Zellen der Gruppe 1 enthalten eine blaustichig rot gefärbte Substanz, die den ganzen Zelleib einnimmt. Das Cytoplasma der Gruppe 2 färbt sich in hellem Zinnoberrot an. Die Elemente der Gruppe 3 lassen sich mit Pseudoisocyanin nicht elektiv hervorheben. Das granulierte Cytoplasma der großen Zellen der Gruppe 4 ist schwach rot getönt. In den zellfreien medialen Bezirken des Cerebralorgans finden sich deutlich rot bis rotviolett gefärbte Granula, die teilweise zu Perlschnüren aufgereiht sind. Es läßt sich nicht sicher entscheiden, ob sie intra- oder extraaxonal liegen. Mit Hilfe der Gomorifärbung gelingt die Darstellung dieses tropfigen Materials hier nicht (vgl. jedoch Schlundkonnektive, s. S. 428).

c) Aldehydfuchsin. Nach Färbung mit Aldehydfuchsin erscheint das ganze Cerebralganglion in transparentem, hellem Blauviolett, von dem sich die neurosekretorischen Zellen in weinroter Tönung abheben (vgl. hierzu Herlant-Meewis 1956). Die kleinen Zellen zeichnen sich durch verschiedene Intensität der Rotfärbung ihres Inhaltes aus. Ihr Cytoplasma ist mehr oder weniger deutlich granuliert. Die großen, zum Teil vakuolisierten Elemente nehmen den Farbstoff nur spärlich an. Bei allen Zellen findet sich das großtropfige rotgefärbte Material nahe der Zelloberfläche, die sich in blauer Farbe darstellt. Besonders gut lassen sich nach Aldehydfuchsinfärbung die Nervenzellfortsätze verfolgen. Gelegentlich erkennt man weinrot gefärbtes Material in Form eines feinen Streifens an der Oberfläche eines Axons. Ferner sieht man winzige Tröpfchen im Axoplasma. Perlschnurartig aufgereihte Granula, wie sie bereits mit Pseudoisocyanin dargestellt wurden, findet man im Zentrum des Cerebralorgans selten.

d) Sudanschwarz. Eine Differenzierung der verschiedenen Zellgruppen durch Färbung mit Sudanschwarz mißlingt. Einzelheiten der Zellstruktur sind nicht auszumachen.

e) Massonfärbung in der Modifikation nach GOMORI = *Gomori II.* Der Versuch, den Sekretinhalt der Zellen mit der Gomori II-Färbung darzustellen, war erfolglos. Granula außerhalb der Perikaryen ließen sich nicht sichtbar machen.

f) Silberimprägnationen. Auch durch Silberimprägnationen lassen sich nach unseren Erfahrungen verschiedene Zelltypen nicht darstellen. Mit der Methode nach BODIAN-ZIESMER kann man lediglich große und kleine Zellen hervorheben, die dunkler oder heller imprägniert sind. Man erkennt perlschnurartig aufgetriebene Axone.

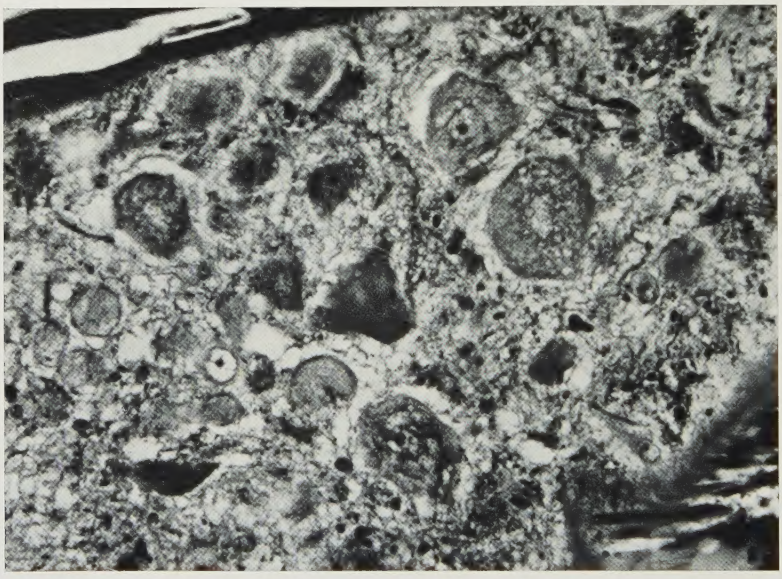


Abb. 7. Mit Chromalaunhämatoxylin gefärbte Sekretgranula in den Schlundkonnektiven (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 460fach)

2. Schlundkonnektive. *a) Chromalaunhämatoxylin-Phloxin.* Das Färbungsbild der Schlundkonnektive nach Anwendung von Chromalaunhämatoxylin-Phloxin ähnelt dem des Cerebralganglions. Kleine, homogen blauschwarz gefärbte Zellen, wie sie im Cerebralorgan vorkommen, sind selten. Die der 2. Gruppe entsprechenden Elemente besitzen zahlreiche Cytoplasmavakuolen. Phloxinophile Neurosekretzellen der Gruppe 3 werden vermißt. Zellen der Gruppe 4 werden in gleicher Häufigkeit wie im Cerebralganglion angetroffen. Auf vielen Schnitten erkennt man hauptsächlich in der Peripherie gelegene Ansammlungen von blauschwarzen Granula außerhalb der Perikaryen. Teilweise verdecken sie die Gewebestruktur derart, daß ihre Lokalisation nicht ausgemacht werden kann. Außer diesen Tröpfchenanhäufungen findet man Ketten von Granula, die meistens vom Zentrum in die Peripherie der Schlundkonnektive ziehen. Der größte Teil der freien, nicht in Perikaryen gelegenen Granula bleibt auf die Konnektive beschränkt. Sie gruppieren sich auffällig deutlich um die hier stark ausgebildeten Blutkapillaren.

b) Pseudoisocyanin. Mit Pseudoisocyanin lassen sich nur ganz vereinzelt Zellen der 1. Gruppe darstellen. Die Struktur der Schlundkonnektive wird vielfach durch die rot gefärbten Granula und Tröpfchen verdeckt.

c) Aldehydfuchsin, Sudanschwarz. Mit beiden Färbeverfahren lassen sich neue Zellformen nicht darstellen.

3. Unterschlundganglion. Die Schlundkonnektive vereinigen sich zu dem Unterschlundganglion. Am Rande und in der Mitte ihrer zusammentretenden Schenkel liegen die Nervenzellen, während der Bezirk zwischen den Zellgebieten von Axonen eingenommen wird. Die am Vereinigungswinkel gelegenen Nervenzellen bilden einen Keil, dessen Spitze sich in das Bauchmark erstreckt. Die übrigen Perikaryen liegen peripher. Die Zahl der großen Zellen überwiegt.

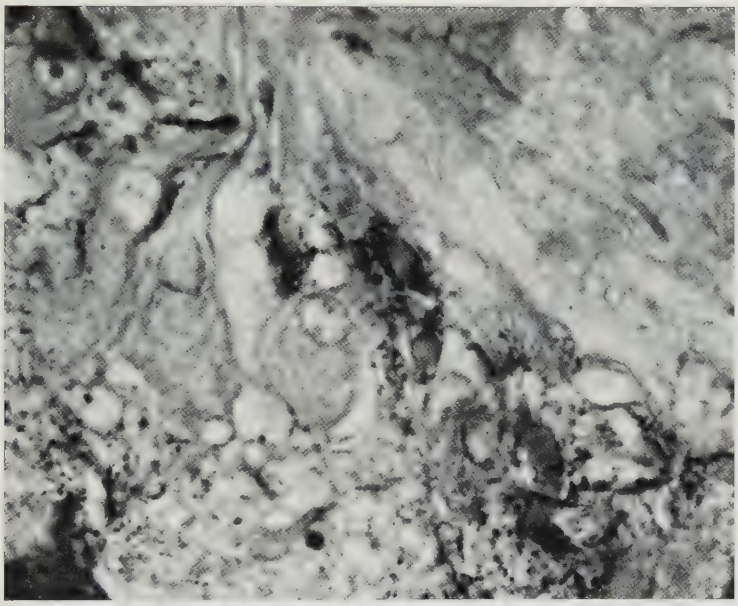


Abb. 8. Perikapilläre Sekrettröpfchen (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 870fach)

a) Chromalaunhämatoxylin-Phloxin. Die Elemente der 1. und 2. Zellgruppe verhalten sich wie die entsprechenden Zellen im Cerebralganglion. Perikaryen, die völlig mit phloxinophilem Material gefüllt sind, wurden nicht gefunden. Wie im Cerebralganglion kommen auch im Unterschlundganglion große Zellen mit teils wabigem, teils gekörntem Cytoplasma vor. Die von H. Hubl (1956) beschriebenen u-Zellen treten mit tiefblauschwarz granulierten Perikaryen hervor, wie sie für die kleinen Zellen der 1. Gruppe bezeichnend sind. Die Tröpfchen sind nicht immer deutlich gegeneinander abgegrenzt, so daß der Zelleib einen homogenen Aspekt gewinnt. Wenngleich diese intensiv gefärbten Zellen in diesem Gebiet sehr selten sind, so zeigen sie doch keine deutlichen morphologischen Unterschiede gegenüber den Elementen der Gruppe 1 im Cerebralganglion.

Die Anfärbbarkeit des außerhalb der Perikaryen gelegenen tropfigen Materials ist besonders intensiv. Parallel zu den Nervenfasern ziehen scharf konturierte Ketten blauschwarz färbbarer Tröpfchen; wahrscheinlich handelt es sich um innerhalb der Axone gelegenes Neurosekret.

b) Gomori II. Mit der Modifikation der Massonschen Trichromfärbung kommen zahlreiche Kapillaren, die das ganze Organ durchziehen, zur Darstellung.

Für die Differenzierung verschiedener neurosekretorischer Zelltypen eignet sich diese Färbung nicht.

c) Aldehydfuchsin. Aldehydfuchsin färbt die kleinen Zellen wie im Cerebralganglion und in den Schlundkonnektiven besonders intensiv rot violett. Eine neue Zellgruppe wurde nicht gefunden.

4. Das Bauchmark. Die Nervenzellen des Bauchmarkes liegen wie die des Unterschlundganglions peripher, sind jedoch weniger zahlreich. Gruppen granulierter Zellen beobachtet man an den Abgangsstellen der Nerven aus dem Bauchmark. Das Zustandsbild der neurosekretorischen Zellen nach Färbung mit Chromalaunhämatoxylin-Phloxin, Gomori II und Aldehydfuchsin entspricht dem bisher beschriebenen. Phloxinophile Auftreibungen der Axone werden sehr zahlreich, mit Chromhämatoxylin färbbare Granula dagegen in verschwindend kleiner Zahl dargestellt. Die sog. Kolossalfasern sind frei von jedem Sekret.

a) Sudanschwarz. Auffällig sind die in der Peripherie des Bauchmarkstranges gelegenen, mit Sudanschwarz stark färbbaren Ansammlungen von Granula. Es konnte nicht entschieden werden, ob diese Granula und Tröpfchen intra- oder extracellulär liegen.

b) Silberimprägnationen. Die Nervenzellfortsätze lassen sich im Bauchmark sehr viel besser als in den übrigen Abschnitten des Nervensystems imprägnieren. Besonders klar beobachtet man in Silberpräparaten nach BODIAN-ZIESMER Nervenfasern mit umschriebenen Quellungen oder Verdickungen; letztere sind kleiner als die färberisch darstellbaren Granula. Auch spiralig gewundene Axone werden erfaßt. Sehr gut erkennt man, daß die an den Nervenabgangsstellen gelegenen Ganglienzellen ihre Axone hauptsächlich in die abgehenden Nerven entsenden.

Die oben beschriebenen Zellformen werden nunmehr zu den von HARMS, SCHARRER und HUBL geschilderten Formen in Beziehung gesetzt: Die kleinen, homogenen, intensiv gefärbten Zellen der Gruppe 1, die am zahlreichsten im Cerebralganglion, vereinzelt in den Schlundkonnektiven und dem Unterschlundganglion und nur sehr selten auch im Bauchmark vorkommen, entsprechen den von J. W. HARMS beschriebenen a-Zellen. Die Scharrerschen b-Zellen gleichen dem Zelltyp der in dieser Arbeit charakterisierten Gruppe 2; sie kommen in allen Gebieten der untersuchten Nerven vor. Für die als Elemente der Gruppe 3 geschilderten Formen findet sich in den Mitteilungen der genannten Autoren keine Parallele. Die großen Zellen der Gruppe 4 wurden von HARMS als c- und d-Zellen bezeichnet. Ihre Zahl nimmt relativ vom Cerebralganglion über die Schlundkonnektive und das Unterschlundganglion bis zum Bauchmark ständig zu.

II. Histochemische Reaktionen

Mit Hilfe der Cholinesterase- und Bernsteinsäuredehydrogenasereaktion ließ sich das Cerebralganglion auf Querschnitten durch das ganze Tier nicht hervorheben. Die Reaktion des neurosekretorischen Materials ist allenthalben negativ.

III. Der Komplex nach H. HUBL

Die von H. HUBL (1957) bei verletzten Tieren beschriebenen Komplexe konnten auch *bei gesunden Exemplaren* von Lumbriciden gefunden werden. Außer

im Cerebralganglion wurden Komplexe auch in den Schlundkonnektiven nachgewiesen. Die unscharf begrenzten Komplexe bestehen aus einem wabigen

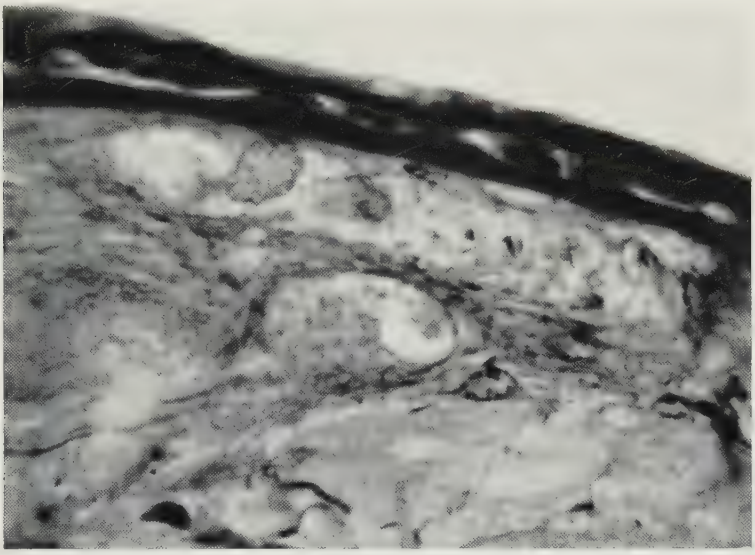


Abb. 9. Verwaschen konturierter „Komplex" in der Peripherie der Schlundkonnektive (Bouinsches Gemisch, Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 1080fach)

Gewebe, das zum Teil rundliche, offenbar in Degeneration begriffene Zellen enthält, zum Teil bald optisch leere, bald mit Granula gefüllte rundliche Gebilde,

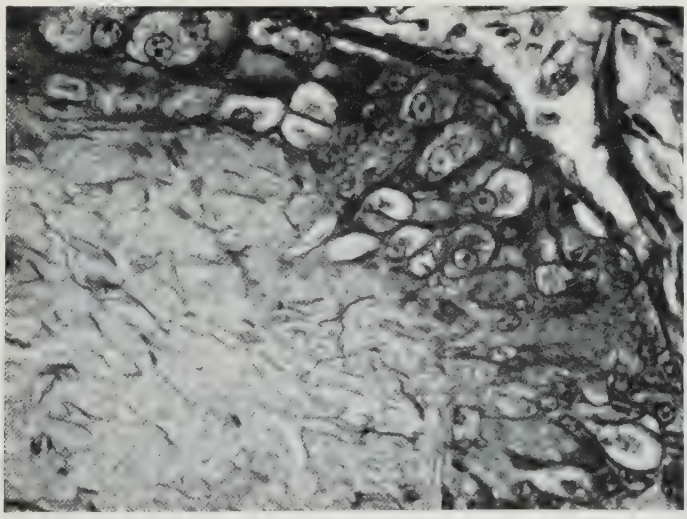


Abb. 10. Anhäufung vakuolisierter Zellen bei feuchtgehaltenen Würmern (Bouinsches Gemisch Chromalaunhämatoxylin-Phloxin; Vergr. 430fach)

anscheinend Anschnitte von Nervenfasern. Andere Zellen stellen sich in verschiedenen Erscheinungsformen dar. Man sieht große Elemente, deren Zelleib blau und rot gefärbte Körnchen enthält (der Gruppe 4 entsprechend), ferner

kleine Zellen mit weitgehend aufgelockertem, daher hell erscheinendem Cytoplasma. Lediglich an der Kernoberfläche erkennt man phloxinophile Granula. Die Frage bleibt offen, ob und welche Substanzen aus dem Cytoplasma herausgelöst sind. Es bestehen keine Anhaltspunkte dafür, daß es sich bei den von HUBL genannten Komplexen um Zellformationen handelt, die grundsätzlich von den bisher beschriebenen Nervenzellen des Regenwurmes abweichen.

IV. Veränderungen der neurosekretorischen Zellen unter verschiedenen Umweltsbedingungen

Wie erwähnt, wurden verschiedene Würmer unter bezüglich der Feuchtigkeit und der Temperatur verschiedenen Bedingungen gehalten. — Die feuchtgehaltenen Würmer (Gruppe A und D, s. S. 423) zeigen gegenüber den der Trockenheit ausgesetzten Tieren (B und C) wenige Zellen der Gruppe 1, jedoch eine größere Anzahl Zellen der Gruppe 2 und vakuolisierte Elemente der Gruppe 4. Umgekehrt verhalten sich die Granula in den Schlundkonnektiven: Während wir bei den feuchten A-, D-Würmern zahlreiche, große deutlich sichtbare Granula finden, sind dieselben klein, weniger zahlreich und fein verteilt bei den trockenen B-, C-Würmern. Komplexe nach HUBL beobachtet man auf Schnittserien der A-, C-, D-Würmer; sie unterscheiden sich morphologisch nicht voneinander.

In den Cerebralganglien der in feuchtem Milieu gehaltenen A-Würmer fallen besonders einige Zellen der Gruppe 2 mit großem Kern und locker gebautem Cytoplasma auf. Auch sieht man Zellen der Gruppe 3 mit phloxinophilen tropfigen Einschlüssen. In der Peripherie der Schlundkonnektive findet man eine große Zahl dicker Sekrettröpfchen, die die Gewebestruktur streckenweise völlig verdecken.

Die Untersuchungen der der Austrocknung ausgesetzten B-Tiere wurden infolge Schrumpfung des Gewebes sehr erschwert. Doch zeigte sich in einigen Schnitten deutlich eine große Zahl von Zellen der Gruppe 1, während das wabig erscheinende Nervengewebe nur ganz schwach mit Phloxin gefärbte, vereinzelte Granula aufwies.

Besser sind Einzelheiten bei den in sehr geringer Feuchtigkeit gehaltenen Würmern der Gruppe C auszumachen. Viele schwarzblau gefärbte, kleine Zellen der Gruppe 1 und nur wenige Elemente der Gruppe 2 finden sich im Cerebralganglion. Die freien Granula sind sehr klein und treten nur ganz vereinzelt auf.

Schnitte durch die in schlammiger Erde gehaltenen Würmer (D) zeigen charakteristische Ansammlungen von Granula an den Kapillaren. Ein Übertritt der Tröpfchen in die Kapillarlichtung wurde jedoch nicht festgestellt. Bei diesen Tieren werden auch Granula im Bauchmark in Höhe der ersten Nervenabgangsstelle beobachtet.

Einen ganz augenfälligen Unterschied zu den eben beschriebenen Lumbriciden lassen die eingefrorenen E-Würmer erkennen. Deutlich treten hier Kapillaren hervor, doch sind Granula nur mit Mühe und ganz vereinzelt festzustellen. Zellen der Gruppe 1 sind ganz selten zu beobachten, zahlreicher dagegen die Elemente der Gruppe 2 und ihre Zwischenstufen. Durch ihre Vielzahl fallen die stark vakuolisierten Perikaryen der Gruppe 4 auf. Zellen der Gruppe 3 sind nicht selten zu erkennen. Die meisten Kerne aller Zellformen besitzen keine oder nur wenige Kernkörperchen; sie erscheinen optisch leer.

Die Nervenzellen der im Frühjahr während der ersten warmen Tage gefangenen Würmer (F) wiesen eine gewisse Parallele zu denen der gefrorenen E-Tiere auf. Zwischen dicht gepackten zahlreichen Zellen der Gruppe 3 treten nur einige Elemente der Gruppe 1 hervor. Auch vereinzelte Zellen der anderen Gruppen lassen sich im Cerebralganglion beobachten. In einzelnen Perikaryen findet man nebeneinander gomoriblaue und phloxinophile Granula.

Die Zahl der Zellen der Gruppe 1 nimmt bei den Mai-Würmern (G) zu, während die phloxinophilen Elemente und Vakuolen nur noch selten zu erkennen sind.

Den allgemeinen morphologischen Betrachtungen (vgl. Kap. C, s. S. 423) wurden die Befunde an den im Hochsommer gefangenen Tieren zugrunde gelegt. Deutliche Veränderungen der großen Zellen (Gruppe 4) wurden bei dieser Versuchsreihe nicht beobachtet.

D. Diskussion

Die von J. W. Harms (1947—1949) und H. Hubl (1953, 1956) im Nervensystem von *Lumbricus* unterschiedenen Zelltypen lassen sich auch mit Chromalaunhämatoxylin-Phloxin und Pseudoisocyanin elektiv darstellen, sind jedoch nicht scharf voneinander unterscheidbar. Halb homogen blauschwarz, halb gekörnte Zellen (halb a-, halb b-Zelle), Elemente mit phloxinophilem neben gomoriblauem Cytoplasma und die Farbskala von Rot nach Blau sprechen deutlich für eine Zusammengehörigkeit der Zellgruppen 1, 2 und 3.

Dasselbe gilt für die großen, von Harms als c-, d- und Hubl als c-Zellen benannten Elemente der Gruppe 4. Hier lassen sich besonders eindrucksvoll alle Zwischenstufen von der ganz mit Cytoplasma gefüllten bis zur vakuolisierten Zelle darstellen. Eine engere Beziehung aller Zellen zueinander lassen die Zellformen, die nach Volumen und Farbintensität eine Mittelstellung zwischen den kleinen und großen Zelltypen einnehmen, vermuten. Die Tatsache ferner, daß das gehäufte Auftreten der einen Gruppe mit einer relativen Verminderung der anderen einhergeht (vgl. hierzu S. 432), unterstreicht die Annahme, daß es sich bei den Zelltypen um *verschiedene Funktionszustände eines Sekretionszyklus* handelt, wie schon Brandenburg (1956) annimmt.

Zugunsten der Annahme eines Sekretionszyklus spricht auch das lokalisatorische Verhalten der Zellen. Die Elemente der Gruppe 1 und 2 (a-, b-Zellen) sind nämlich nicht auf das Cerebralganglion beschränkt, wie angenommen wurde. Die von H. Hubl (1957) als u-Zellen bezeichneten Elemente werden der Gruppe 1 zugerechnet, da sie, abgesehen von ihrem gleichen morphologischen Verhalten, auch bei experimentell ungeschädigten Tieren gefunden werden. Es muß zwar eingeräumt werden, daß tiefblaue, homogen erscheinende Zellen der Gruppe 1 hauptsächlich im Cerebralganglion in dieser Form hervortreten; die in den Schlundkonnektiven, Unterschlundganglion und Bauchmark gefundenen zeigen nur selten diese intensive Kolloidfüllung. Alle beschriebenen Zellen wurden aber in jedem Gebiet des untersuchten Nervengewebes bei als normal anzusehenden Tieren gefunden.

Das verschieden anfärbbare Sekret wird auch in Form deutlich sichtbarer *Granula außerhalb der Perikaryen* dargestellt, wobei die gomoriblauen Granula stark überwiegen. Die phloxinophilen Tröpfchen werden am zahlreichsten in den

Komplexen beobachtet. Im Bauchmark werden die erwähnten mit Phloxin darstellbaren Auftreibungen und selten rote Granula gesehen. Bei dem Verschwinden der zahlreichen Zellen der Gruppe 1 und 2 und der mit Chromalaunhämatoxylin färbbaren Sekrettröpfchen im Frühjahr treten viele phloxinophile Perikaryen ohne gleichzeitige Vermehrung des phloxinophilen Sekretes außerhalb der Zellen auf. Ob den verschieden färbbaren Sekreten jeweils eine besondere Funktion zufällt oder ob die phloxinophile Substanz eine Vorstufe der chromhämatoxylinophilen darstellt, konnte nicht entschieden werden (vgl. hierzu Herlant-Meewis 1956).

Eine Abgabe des Sekrets an die Blutbahn konnte nicht nachgewiesen werden, doch kann diese Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, da die Kapillaren besonders im Gebiet der Zellen und in den Schlundkonnektiven vermehrt auftreten und Sekrettröpfchen nur ganz vereinzelt im Zentrum der Ganglien gesehen werden. Der Nachweis der örtlichen Anreicherung des Sekrets an Kapillaren, die teilweise auch von Axonen umgeben sind, spricht zugunsten dieser Ansicht.

Der größte Teil des außerhalb der Perikaryen gelegenen neurosekretorischen Materials wird in der Peripherie der Schlundkonnektive beobachtet, eine verschwindend kleine Menge im Unterschlundganglion und Bauchmark. Eine Ausnahme bilden die im Zentrum des Cerebralganglions mit Pseudoisocyanin darstellbaren Granulareihen. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß tropfiges Kolloid im Axon nahe dem Perikaryon auftritt. Vom Perikaryon entfernte Nervenzellfortsätze zeigen keine Granula, doch sind sie stellenweise gequollen und aufgetrieben. Möglicherweise ist das Sekret in diesen Fasern vorhanden, entzieht sich aber dem lichtmikroskopischen Nachweis.

Eine Beteiligung des Kernes am Sekretionsprozeß, besonders eine Kernsekretion, wie sie unter anderem von Ortmann (1958) für den Karpfen beschrieben wurde, konnte nicht festgestellt werden. Kerneinschlüsse oder Lappungen, wie sie Sano (1958) in der Neurophysis spinalis caudalis findet, lassen sich nicht nachweisen.

Über die Funktion des Sekretes lassen sich keine Angaben machen. Auch die jahreszeitlichen Veränderungen zusammen mit den Ergebnissen von H. Hubl bei geschlechtsreifen und juvenilen Würmern (vgl. Herlant-Meewis) erlauben keine weiteren Schlüsse.

Zusammenfassung

1. Im Cerebralganglion, den Schlundkonnektiven, im Unterschlundganglion und im Bauchmark des Regenwurmes werden neurosekretorische Zellen hauptsächlich mit Aldehydfuchsin, Azan und Chromalaunhämatoxylin-Phloxin dargestellt. Als ein brauchbares, die bisher üblichen Methoden ergänzendes Verfahren erwies sich die *Färbung mit Pseudoisocyanin*, die von Schiebler (1958) als Methode zur Darstellung von Neurosekret der Wirbeltiere angegeben wurde.

2. Mit den angegebenen Färbungen kann man folgende Zustandsbilder neurosekretorischer Zellen erfassen: Intensiv färbbare kleine, prall mit chromhämatoxylinophilem Sekret gefüllte Elemente (Gruppe 1); Zellen mit schwächer färbbarem, aufgelockertem Cytoplasma (Gruppe 2); Elemente mit meist homogenem phloxinophilem Sekret (Gruppe 3); große Zellen mit gekörntem, aufgelockertem, gomoriblauem Cytoplasma (Gruppe 4).

3. Die Frage, ob die geschilderten Zellbilder Ausdruck eines Sekretionszyklus sind, wird im Anschluß an Brandenburg (1956) bejaht. Folgende Erscheinungen sprechen für diese Auffassung: a) Das Nebeneinander unterschiedlich gefärbter

Cytoplasmazonen und homogener sowie granulierter Bereiche innerhalb einer Zelle; b) das Vorkommen der Zellen in allen untersuchten Regionen des Nervensystems, wenn auch in unterschiedlicher Zahl; c) die Häufung einer Gruppe bei gleichzeitiger Verminderung der anderen.

4. Außer dem chromhämatoxylinophilen wird ein *phoxinophiles Sekret* besonders in Zellen des Cerebralganglions festgestellt.

5. Eine Ansammlung gomoriblauer Sekrettröpfchen findet sich in der Peripherie der Schlundkonnektive; sie lassen sich nicht mit Sicherheit in eine Zelle oder Nervenfaser lokalisieren. Deutlich intraaxonale Granula werden nur nahe dem Zelleib gesehen. Im Bauchmark kann man lediglich aufgetriebene Nervenfasern und zu Perlschnüren aufgereihte Granula ausmachen. Im Cerebralganglion erkennt man freie Granula medial von den Zellen nach Färbung mit Pseudoisocyanin.

6. Die perikapilläre Anreicherung von neurosekretorischen Granula läßt vermuten, daß ein Stoff an die Blutbahn abgegeben wird.

7. Die Beobachtungen an den bei unterschiedlicher Feuchtigkeit und Temperatur gehaltenen Würmern sprechen für einen deutlichen Wechsel im quantitativen Verhalten der einzelnen Zellgruppen zueinander. a) Bei den trocken gehaltenen Würmern findet man eine deutliche Häufung der Zellen mit starker Kolloidfüllung (Elemente der Gruppe 1), während Zellen mit schwächer anfärbbaren Perikaryen (Gruppe 2) nur ganz vereinzelt festzustellen sind. Andererseits sind in den Schlundkonnektiven nur wenige Granula anzutreffen. b) Bei den feuchtgehaltenen Tieren findet man nur vereinzelte, tief dunkel gefärbte Zellen. Die Perikaryen mit locker strukturiertem Cytoplasma (Gruppe 2) sind hier zahlreicher. Nicht genauer lokalisierbare gomoriblaue Sekrettröpfchen in den Schlundkonnektiven lassen sich dagegen in großer Menge nachweisen. c) Das Nervensystem eingefrorener Regenwürmer enthält nur wenige sekretgefüllte Elemente (Gruppe 1). Dagegen fallen große, stark vakuolisierte Zellen (Gruppe 4) ins Auge. In den Schlundkonnektiven lassen sich nur noch vereinzelte Granula sichtbar machen. d) Das Zurücktreten von Zellen der Gruppe 1 wurde auch bei im Frühjahr gefangenen Tieren beobachtet, gleichzeitig eine Zunahme der Zellen mit phloxinophilem Sekret (Gruppe 3).

Literatur

Bargmann, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **34**, 610—634 (1949).

Brandenburg, J.: Neurosekretorische Zellen des Regenwurms. Naturwissenschaften **43**, 453 (1956).

Clark, R. B.: The posterior lobes of the brain in Nephthys and the mucus-glands of the prostomium. IV. Quart. J. micr. Sci. **96** (1955).

Eichner, D.: Zur Frage der Neurosekretion der Ganglienzellen des Nebennierenmarkes. Z. Zellforsch. **36**, 293—297 (1951).

Foot, N. Ch.: The Masson trichrom staining methods in routine laboratory use. Stain Technol. **8**, 101—110 (1933).

Gerebtzoff, M. A.: Recherches histochimiques sur le acétylcholine et cholinestérase. Acta anat. (Basel) **19**, 366—379 (1953).

Gomori, G.: A rapid one step trichrom stain. Amer. J. clin. Path. **20**, 661—664 (1950).

Harms, J. W.: Über ein inkretorisches Cerebralorgan bei Lumbriciden, sowie Beschreibung eines verwandten Organs bei drei neuen Lycastisarten. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **143**, 332—346 (1947—1949).

Herlant-Meewis, H.: Neurosécrétion chez les Oligochètes. Bull. Acad. roy. Méd. Belg., Kl. Sci. **41** (1955).

— Croissance et neurosécrétion chez *Eisenia foetida* (Sav.). Ann. Sci. Nat., Zool. 11. sér. **18**, 185—198 (1956).

Hubl, H.: Über formbildende Beeinflussung der Regeneration am Hinterende bei Lumbriciden durch Implantation von Kopfregenerationsgewebe. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **145**, 249—266 (1951).

— Die Inkretorischen Zellelemente im Gehirn der Lumbriciden. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **146**, 421—432 (1953).

— Über die Beziehung der Neurosekretion zum Regenerationsgeschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen Zelltyps im Unterschlundganglion. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **149**, 73—87 (1956).

Ortmann, R.: Neurosekretion und Proteinsynthese. Z. mikr.-anat. Forsch. **64**, 215—227 (1958).

Sano, Y.: Über die Neurophysis (sog. Kaudalhypophyse, „Urohypophyse") des Teleostiers Tinca vulgaris. Z. Zellforsch. **47**, 481—497 (1958).

— Weitere Untersuchungen über den Feinbau der Neurophysis spinalis caudalis. Z. Zellforsch. **48**, 236—260 (1958).

Scharrer, B.: Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. Naturwissenschaften **25**, 131—138 (1937).

Scharrer, E.: Über die Beteiligung des Zellkerns an sekretorischen Vorgängen in Nervenzellen. Frankfurt. Z. Path. **47**, 143—151 (1934).

Scharrer, B. u. E.: Über die Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorischen Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Biol. Rev. **12**, 185—216 (1937).

Schiebler, T. H.: Darstellung von B-Zellen in Pankreasinseln und von Neurosekret mit Pseudoisocyanin. Naturwissenschaften **45**, 214 (1958).

Schmid, L. A.: Induced neurosecretion in Lumbricus terrestris. J. exp. Zool. **104**, 365—378 (1947).

Peter Otremba, Anatomisches Institut der Universität Kiel, Neue Universität, Eingang F 1

Zeitschrift für Zellforschung 54, 437—442 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. E. Hintzsche)

HISTOCHEMISCHE BEOBACHTUNGEN AM SACCUS VASCULOSUS DER FORELLE

Von

L. O. Zwillenberg

Mit 2 Textabbildungen

(Eingegangen am 29. April 1961)

In letzter Zeit mehren sich die Beobachtungen, die zugunsten einer sekretorischen Funktion der Kröncheńzellen im Saccus vasculosus sprechen (Bargmann 1954; Dorn 1955; Stahl und Seite 1960; van de Kamer *et al.* 1960; Jansen und van de Kamer, im Druck; dort weitere Literatur). Im Zuge einer Untersuchung der Forellenhypophyse, über die später zu berichten sein wird, konnten einige Feststellungen am Saccus vasculosus gemacht werden, die die Arbeiten von van de Kamer u. Mitarb. nicht nur hinsichtlich einiger histochemischer Gegebenheiten ergänzen, sondern auch insofern, als unsere Resultate zum größeren Teil an Fischen unter natürlichen Verhältnissen gewonnen wurden.

Material und Technik

Untersucht wurde der Saccus vasculosus von Bachforellen (*Salmo trutta* L. forma *fario* L.), die zur Hauptsache in der Rothachen, einem Zufluß der Aare, gefangen wurden, sowie von Regenbogenforellen (*Salmo irideus* Gibb.) der Kantonalen Fischzuchtanstalt Faulensee, im Zeitraum Juli 1960 bis Februar 1961[1]. Die Gehirne mit anhängendem Saccus vasculosus wurden lebensfrisch im ganzen fixiert, entweder im Chromalaun-Sublimat-Formolgemisch nach Elftman (1957) oder in mit Sublimat gesättigtem 10%igem Formol. Für histochemische Zwecke wurde nur Sublimat-Formolmaterial verwendet, um eine zusätzliche Oxydation zu vermeiden. Die Fixierung geschah bei den Bachforellen wenn irgend möglich im Feld, oft unmittelbar nach dem Fang (Fixationsdauer 18—48 Std). Von dem über Cyclohexanon in Paraffin eingebetteten Material wurden 5—7 μ dicke Serienschnitte in der Sagittalebene angefertigt. Angewandt wurden die folgenden Färbungen und histochemischen Reaktionen:

Azan *(M. Heidenhain)*; Perjodsäure-Leukofuchsin (PAS)-Reaktion mit Hämalaunnachfärbung; Perameisensäure-Alcianblau (PFAAB)-PAS-Orange G nach Adams und Pearse (1959); 2%iges Alcianblau 8 GS („Chroma") in 2 n H_2SO_4 während einer Stunde ohne vorherige Oxydation, entweder mit Kernechtrotnachfärbung oder mit anschließender PAS-Reaktion; Alcianblau nach Mowry (1956); 0,5%iges wäßriges Toluidinblau während 1—5 Std zur Feststellung von Metachromasie mit anschließender Umfärbung der Schnitte mit 2%igem Alcianblau (s. oben); Aldehydthionin-PAS nach Paget und Ecclestone (1960) mit Orange G-Nachfärbung; 10 min Aldehydthionin nach Paget und Ecclestone (1959) ohne vorherige Oxydation. Der p_H der Aldehydthioninlösung betrug 1,7. Für histochemische Untersuchungen wurde die Entsublimierung durch *Lugol*sche Lösung weggelassen.

Zum histochemischen Zystinnachweis wurde folgendermaßen vorgegangen: Die nicht entsublimierten Schnitte wurden mit Perameisensäure behandelt wie für die Perameisensäure-Alcianblau-Reaktion (Adams und Pearse 1959). Nach dem Auswaschen der Perameisensäure wurden die Schnitte während 18 Std in eine molare Lösung von Anilin in Eisessig eingestellt (Lillie und Glenner 1957). Danach wurden die Schnitte während 10 min in Leitungswasser

[1] Hiermit spreche ich Herrn Ing. agr. F. Funk meinen herzlichen Dank für den Fang der Bachforellen aus. Der Forstdirektion des Kantons Bern bin ich sehr erkenntlich für eine Fangerlaubnis während der Schonzeit und für die Überlassung von Fischen aus der Fischzuchtanstalt Faulensee.

ausgewaschen und während weiterer 10 min mit der obengenannten Aldehydthioninlösung gefärbt. Schließlich wurden sie kurz mit Leitungswasser abgespült und mit Kernechtrot nach Romeis (1948) gegengefärbt. Für diese Reaktion wird die Abkürzung PFANAT *(performic acid-aniline-aldehyde-thionine)* vorgeschlagen.

Ergebnisse

Bei Anwendung der PFAAB-PAS-Orange G-Methode fallen im Saccus vasculosus von gewissen Individuen der beiden untersuchten Forellenarten einzelne Krönchenzellen oder Gruppen davon auf, die sich durch eine mehr oder weniger

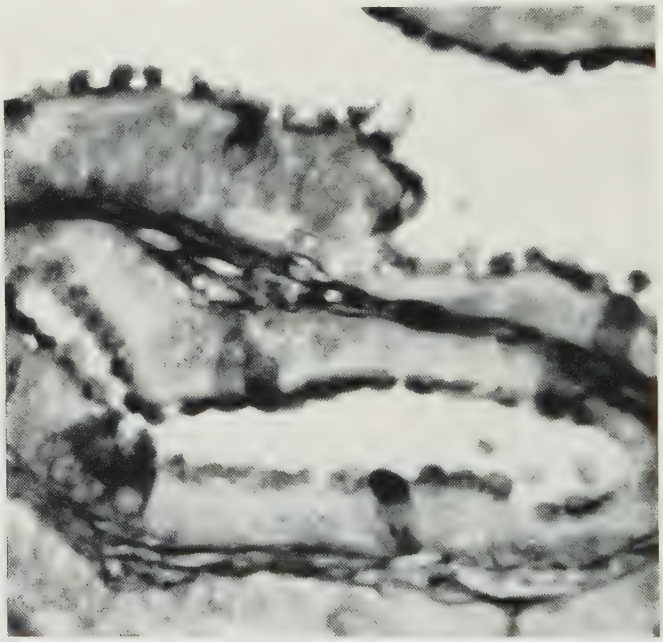


Abb. 1. Stärkere Anfärbung durch Alcianblau von einzelnen und gruppenweise angeordneten Krönchenzellen im Saccus vasculosus der Bachforelle. PFAAB-PAS-Orange G. 7 μ. Vergr. 550fach

kräftige, homogene Blaufärbung ihres gesamten Zytoplasmas von den benachbarten Krönchenzellen unterscheiden (Abb. 1, 2). Im allgemeinen ist diese Blaufärbung, jedenfalls bei visueller Beurteilung, nirgends im Zytoplasma deutlich rotstichig. Ab und zu ist aber im kopfartigen Fortsatz *(apical protrusion)* auch anderer Krönchenzellen PAS-positives Material vorhanden, das der Extraktion mit Perameisensäure Widerstand geleistet hat. Die kugeligen Verdickungen der Krönchenhaare aller Krönchenzellen sind von einer tiefblauen Substanz überzogen. Wo der kolloidartige Inhalt des Saccuslumens im Schnitt erhalten ist, ist er ebenfalls tiefblau gefärbt. Auch das Kollagen wird blau angefärbt. Das gleiche Bild sieht man jedoch auch dann, wenn man das Alcianblau ohne jegliche vorherige Oxydation verwendet.

Die Aldehydthionin-PAS-Methode bzw. die PAS-Methode für sich allein kann ebenfalls das Zytoplasma einzelner Krönchenzellen oder Gruppen davon durch eine blaue bzw. rote Anfärbung hervorheben, aber in schwächerem Maße als bei Färbung mit der 2%igen Alcianblaulösung. Auch die Azanfärbung kann einzelne Krönchenzellen schwach kontrastieren.

Die Häufigkeit der durch Alcianblau anfärbbaren Krönchenzellen und ihre Verteilung im Saccusepithel schwanken stark von Individuum zu Individuum. Sowohl bei der Bachforelle wie bei der Regenbogenforelle befinden sich die meisten und am stärksten angefärbten Zellen an der ventralen Saccuswand. Obwohl der Eindruck besteht, daß diese Zellen um blutleere Sinus häufiger sind, konnte bis jetzt keine eindeutige Korrelation mit dem Füllungszustand der Blutsinus erhoben werden. Auch dieser Füllungszustand wechselt stark von Individuum zu Individuum, wie sich schon makroskopisch feststellen läßt, vor allem bei der Bachforelle. Korrelationen zwischen der Jahreszeit und dem geschlechtlichen Reife-

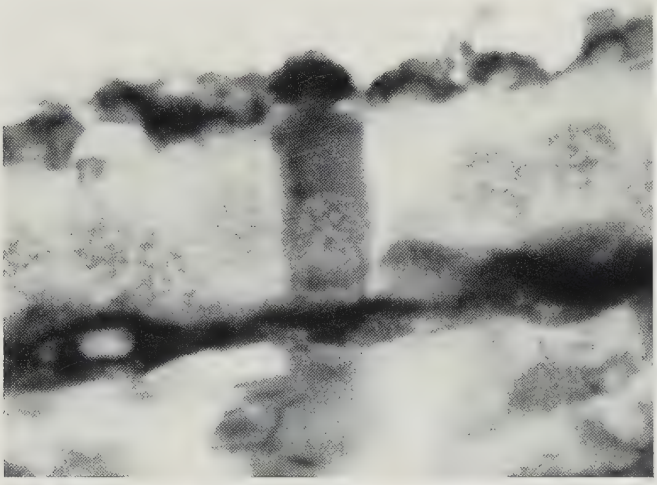


Abb. 2. Einzelne, durch Alcianblau stark angefärbte Krönchenzelle im Saccus vasculosus der Bachforelle. PFAAB-PAS-Orange G. 7 μ. Vergr. 1250fach

zustand einerseits und der Häufigkeit von mit Alcianblau anfärbbaren Krönchenzellen und dem Füllungszustand der Blutsinus andererseits sind bis jetzt aus unserem Material nicht ersichtlich.

Bei beiden Forellenarten sieht man in einzelnen Fällen Krönchenzellen, deren Zytoplasma durch Toluidinblau deutlich metachromatisch gefärbt wird. Bei einer Regenbogenforelle war die Metachromasie sogar kräftig. In diesen Fällen erhält man auch Anfärbung von Krönchenzellen durch Alcianblau nach Mowry und durch Aldehydthionin ohne vorherige Oxydation. Bei Umfärbung der Toluidinblau-Präparate mit 2%igem Alcianblau in 2 n H_2SO_4 heben sich die vorher metachromatischen Krönchenzellen im grünblauen Farbton des Alcianblau von den Nachbarzellen ab.

In anderen Fällen kann jedoch Metachromasie und Anfärbbarkeit durch Aldehydthionin ohne vorherige Oxydation nur im Inhalt des Saccuslumens festgestellt werden, trotzdem sich mit der 2%igen Alcianblaulösung einzelne und gruppenweise angeordnete Krönchenzellen deutlich darstellen lassen. Mit Alcianblau nach Mowry treten solche Zellen dann nur schwach hervor, während sich ihr Zytoplasma mit Aldehydthionin erst nach einer oxydierenden Vorbehandlung anfärben läßt. Bei Verwendung der Perameisensäure-Anilin-Aldehydthionin-Reaktion (PFANAT-Reaktion) ist in diesen Fällen die Anfärbung zwar

schwächer als bei Alcianblaufärbung mit oder ohne Oxydation, hebt aber die betreffenden Krönchenzellen deutlich von ihren Nachbarzellen ab.

Es gibt Übergangsfälle mit Krönchenzellen, deren Metachromasie mit Toluidinblau schwach bis kaum erkennbar ist, die sich jedoch bei Umfärbung mit Alcianblau kräftig anfärben. Die Fälle mit metachromatischen Krönchenzellen waren bis jetzt zu wenig zahlreich, um eine Aussage über einen eventuellen Zusammenhang mit der Jahreszeit oder dem geschlechtlichen Reifezustand zu gestatten.

Diskussion

Van de Kamer *et al.* (1960) stellten bei Experimenten mit Regenbogenforellen fest, daß gewisse Krönchenzellen ein schwach PAS-positives bzw. schwach Aldehydfuchsin-positives Zytoplasma aufwiesen. Des weiteren fanden sie stärker PAS-positives Material in den kopfartigen Fortsätzen gewisser Krönchenzellen. Dasselbe gilt nach den vorliegenden Ergebnissen auch für die Bachforelle unter natürlichen Verhältnissen. Nach Paget und Ecclestone (1959) sind die mit Aldehydfuchsin und Aldehydthionin erhaltenen Resultate vergleichbar.

Van de Kamer u. Mitarb. mutmaßten, daß die Krönchenzellen ein saures Mucopolysaccharid produzieren. Daß der Inhalt des Saccuslumens saures Mucopolysaccharid enthält, wird durch spätere histochemische Untersuchungen von Jansen und van de Kamer (im Druck), ebenfalls an der Regenbogenforelle, sowie durch die vorliegenden Resultate bestätigt. Stahl und Seite (1960) stellten saure Mucopolysaccharide im Saccuslumen einiger anderer Knochenfische fest. Jansen und van de Kamer (im Druck) sahen bei Regenbogenforellen saures Mucopolysaccharid innerhalb der Krönchenzellen hauptsächlich in den Krönchenhaaren und deren kugeligen Verdickungen. Nach unseren Beobachtungen kann saures Mucopolysaccharid sowohl bei der Regenbogenforelle wie bei der Bachforelle im gesamten Zytoplasma von gewissen Krönchenzellen vorkommen.

Die Spezifität der Aldehydfuchsin- bzw. Aldehydthioninfärbung nach Kaliumpermanganat-Oxydation ist beschränkt, da einerseits Kaliumpermanganat kein spezifisches Oxydationsmittel ist und andererseits mit Aldehydfuchsin (und deshalb aller Wahrscheinlichkeit nach auch mit Aldehydthionin) nicht nur auf saure Gruppen sondern ebenfalls auf Aldehyde reagiert wird (s. Pearse 1960, S. 110 bis 111). Dagegen wird die Perameisensäure-Alcianblau-Reaktion für sehr spezifisch für zystinhaltige Strukturen gehalten (Pearse 1960). Letzteres trifft jedoch nur dann zu, wenn das Färberesultat bei Weglassung der Oxydation negativ ist. Dies ist im Saccus vasculosus nicht der Fall. Das Färberesultat mit Alcianblau muß hier als weitgehend unspezifisch betrachtet werden. Es beruht wahrscheinlich auf physikalisch-chemischen Ursachen (Strukturdichte), worauf auch das Resultat der Azanfärbung hinweist. Bekanntlich färbt das Alcianblau auch in saurer Lösung die kollagenen Fasern unspezifisch an (Pearse 1960). Dieser unspezifische Färbeeffekt wird mit Aldehydthionin vermieden. Nach Blockierung der bei Perameisensäure-Oxydation eventuell entstehenden Aldehyde mit Anilin (Lillie und Glenner 1957) kann man sich außerdem die hohe Empfindlichkeit der Aldehydthioninfärbung zunutze machen, um die bei der Oxydation der Disulfidgruppen entstehenden sulfonsauren Gruppen nachzuweisen. Durch den niedrigen p_H der Lösung dürften weniger stark dissoziierende saure Gruppen, wie COOH-Gruppen, ausgeschaltet sein. Eine Kontrollfärbung ohne

Oxydation bleibt auch hier unerläßlich. Im vorliegenden Fall scheint der Schluß gerechtfertigt, daß vor allem bei denjenigen Fischen, bei denen einfaches Aldehydthionin ein negatives Ergebnis zeitigte, die PFANAT-positiven Krönchenzellen sich durch einen höheren Gehalt an Zystin, jedenfalls an Disulfidgruppen, von ihren Nachbarzellen unterschieden.

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß Zystin sich in gewissen Krönchenzellen in solchen Fällen nachweisen läßt, in denen kein saures Mucopolysaccharid in Krönchenzellen dargestellt werden kann. Da Zystin als Ausgangsmaterial bei der Biosynthese von Substanzen mit Sulfatgruppen und sulfonsauren Gruppen herangezogen werden kann (Literatur bei Young und Maw 1958), liegt die Annahme auf der Hand, daß in gewissen Krönchenzellen zystinhaltiges Material erst gespeichert und danach zur Biosynthese von saurem Mucopolysaccharid benutzt wird. Die genannte zeitliche Reihenfolge sowie die tatsächliche Benutzung von Zystin als Schwefelquelle bei der Herstellung des sauren Mucopolysaccharides im Saccuslumen sind jedoch noch zu beweisen, wohl in erster Linie mit autohistoradiographischen Methoden.

Eine der theoretischen Alternativen der Sekretionstheorie, nämlich die Resorptionstheorie, erscheint uns weniger wahrscheinlich, weil Zystin wohl Sulfat und Sulfonsäuren liefern kann, andererseits aber Sulfat im tierischen Organismus nicht zur Synthese von Zystin verwendet wird, es sei denn unter Mitwirkung der Darmflora (s. Young und Maw 1958).

Obwohl also die Sekretionstheorie wiederum eine Stütze erhalten hat, pflichten wir Stahl und Seite (1960) bei, die die Rezeptorhypothese durch den eventuellen Beweis sekretorischer Prozesse nicht als eliminiert erachten.

Summary

The saccus vasculosus of rainbow trout and brown trout, the latter caught in the wild, has been investigated by histochemical means. Isolated coronet cells and groups of them were found to be rather strongly but unspecifically stainable by alcian blue. A performic acid-aniline-aldehyde-thionine reaction demonstrated that such cells contain more disulfide groups than their non-staining neighbours. This higher disulfide content and the stainability by alcian blue do not necessarily coincide with the presence of acid mucopolysaccharide, which was found in the cytoplasm of coronet cells in some cases. The hypothesis is discussed that cystine may be stored and used by coronet cells as a precursor of the acid mucopolysaccharide, which has been shown in the lumen of the organ.

Literatur

Adams, C. W. M., and A. G. E. Pearse: Classification of the mucoid (basophil) cells in the normal and pathological human adenohypophysis. J. Endocr. **18**, 147—153 (1959).

Bargmann, W.: Über Feinbau und Funktion des Saccus vasculosus. Z. Zellforsch. **40**,49 -74 (1954).

Dorn, E.: Der Saccus vasculosus. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. Bargmann, Bd. IV/2. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1955.

Elftman, H.: A chrome-alum fixative for the pituitary. Stain Technol. **32**, 25—28 (1957).

Jansen, W. F., and J. C. van de Kamer: Histochemical analysis and cytological investigations on the coronet cells of the saccus vasculosus of the rainbow trout *(Salmo irideus)*. Z. Zellforsch. (im Druck).

Kamer, J. C. van de, J. Boddingius and J. Boender: On the structure and function of the saccus vasculosus of the rainbow trout *(Salmo irideus)*. Z. Zellforsch. **52**, 494—500 (1960).

Lillie, R. D., and G. G. Glenner: Histochemical aldehyde blockade by aniline in glacial acetic acid. J. Histochem. Cytochem. **5**, 167—169 (1957).

Mowry, R. W.: Alcian blue technics for the histochemical study of acidic carbohydrates. J. Histochem. Cytochem. **4**, 407 (1956).

Paget, G. E., and E. Ecclestone: Aldehyde-thionine: a stain having similar properties to aldehyde-fuchsine. Stain Technol. **34**, 223—226 (1959).

— — Simultaneous specific demonstration of thyrotroph, gonadotroph and acidophil cells in the anterior hypophysis. Stain Technol. **35**, 119—122 (1960).

Pearse, A. G. E.: Histochemistry, theoretical and applied, 2nd edit. London: J. & A. Churchill 1960.

Romeis, B.: Mikroskopische Technik. München: R. Oldenbourg 1948.

Stahl, A., et R. Seite: Contribution à l'étude du sac vasculaire des poissons téléostéens. C. R. Soc. Biol. (Paris) **154**, 1020—1022 (1960).

Young, L., and G. A. Maw: The metabolism of sulphur compounds. London: Methuen 1958.

Dr. L. O. Zwillenberg,
Anatomisches Institut der Universität,
Bühlstr. 26, Bern (Schweiz)

Zeitschrift für Zellforschung 54, 443—467 (1961)

Aus dem Bernhard-Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten Hamburg
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. vet. h. c. E. G. Nauck),
Abteilung für Pathologie
(Abteilungsvorsteher: Prof. Dr. med. H. H. Schumacher)

ONTOGENESE UND TOPOGRAPHISCHE HISTOCHEMIE DER BERNSTEINSÄUREDEHYDROGENASE IN DER LEBER EINIGER NAGER

UNTERSUCHUNGEN ZUR FUNKTIONELLEN GLIEDERUNG DES LEBERPARENCHYMS

Von

W. Kitzing und H. H. Schumacher

Mit 19 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. Januar 1961)

Einleitung

Unsere Vorstellungen über die funktionelle Gliederung des Leberparenchyms gehen durchweg von der Annahme aus, daß die Leberzellen verschiedener Parenchymareale morphologisch und biochemisch relativ einheitlich sind. Unterschiede im Verhalten bestimmter Parenchymareale, die vor allem unter krankhaften Bedingungen in bestimmten Zonen und Sektoren der Läppchen hervortreten, galten als pathologische Phänomene. Sie wurden vornehmlich auf Durchblutungsstörungen jener Areale zurückgeführt, gestützt auf vitalmikroskopische Beobachtungen an Versuchstieren und auf die relationspathologischen Thesen Gustav Rickers. Die Möglichkeit einer primären funktionellen Differenzierung der verschiedenen Parenchymareale wurde zwar in Erwägung gezogen, ließ sich jedoch mit dem üblichen Rüstzeug morphologischer Methodik nur ungenügend untersuchen.

Inzwischen hat die Anwendung neuartiger histochemischer Methoden den Nachweis erbracht, daß die überwiegende Mehrzahl biochemischer Konstituenten inhomogen, aber nach einem bestimmten Muster über das Organparenchym verteilt ist (s. Novikoff 1959). Die histochemischen Befunde sind ferner durch mikrochemische Analysen an topographisch definierten Parenchymarealen so weitgehend bestätigt worden (Shank, Morrison, Cheng, Karl u. Schwarz 1959), daß ihre Realität grundsätzlich nicht mehr zu bezweifeln ist. Damit ergeben sich neue Voraussetzungen für das Verständnis der funktionellen Heterotopie der Leber (Zeiger 1952) und für die Entwicklung umschriebener Parenchymschäden.

Die vorliegende Arbeit berichtet über die histochemisch faßbare Verteilung eines Atmungsfermentes, der *Bernsteinsäuredehydrogenase* (SDH), in der Leber einiger Nager und diskutiert an Hand des Schrifttums und der eigenen Befunde die gegenwärtigen Vorstellungen über die *funktionelle Gliederung des Leberparenchyms.*

Material und Methodik

Die Untersuchungen wurden an Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten ausgeführt, die unter einheitlichen Bedingungen gehalten und mit Standardkost (Standard-Presslinge NAF der Firma Dr. Schott Nachf., Hamburg-Bahrenfeld) ad libitum ernährt wurden. Da orientierende Versuche ergeben hatten, daß histochemisch kenntliches Ferment (SDH) erst kurz ante partum auftritt und innerhalb weniger Wochen post partum eine Konzentration und Verteilung erreicht, die derjenigen beim adulten Tier nahezu entspricht, wurden folgende Altersstufen für die Untersuchung ausgewählt: Feten im letzten Drittel der Tragzeit, ausgetragene Tiere im Alter von 1 Tag, 1 Woche, 2 Wochen, 3 Wochen, 4 Wochen und 5 Wochen. Von jeder Tracht und von jedem Wurf wurden stets mehrere Tiere untersucht, um individuelle Abweichungen im Fermentbestand zu fassen. Offensichtlich kranke Tiere (kenntlich an Abweichungen von Verhalten, Größe, Gewicht und Sektionsbefund) wurden ausgeschieden.

Zur Entnahme der Leber wurden die Tiere im Chloroformrausch laparotomiert und durch Anschneiden der Vena cava rasch entblutet. Die Leber wurde im ganzen herausgelöst, ihr Lobus sinister abgetrennt und in etwa 5 mm dicke Scheiben zerlegt. Diese wurden in einem Röhrchen bei etwa —70° C (Kältemischung aus Trockeneis und Alkohol) innerhalb von 4 min nach Beginn der Narkose eingefroren. Bei Feten wurde die ganze Leber eingefroren und histochemisch untersucht. Der Chloroformrausch hatte keinen Einfluß auf die histochemische Fermentaktivität (kenntlich am identischen Resultat bei Tieren des gleichen Wurfes, die durch Dekapitieren getötet worden waren.

Der histochemische Nachweis des Fermentes (SDH) erfolgte in Anlehnung an das Verfahren von Goebel und Puchtler (1955). Dazu wurden native Gefrierschnitte von 50 μ Schnittdicke 90 min bei 37,5° C unter Luftzutritt in folgendem Medium inkubiert:

Natrium-Succinat (0,2 M)	5,0 ml
Phosphat-Puffer (0,2 M), p_H 7,6 . .	4,5 ml
Tetrazolium-Purpur (2,0 mg/ml) . .	5,0 ml
KCN (2%ig)	0,5 ml
$NaHCO_3$ (0,6 M)	1,0 ml
$AlCl_3$ (0,01 M)	0,4 ml
$CaCl_2$ (0,33 M)	0,1 ml
$MgSO_4$ (0,005 M)	0,1 ml
Aqua dest	3,4 ml

Inkubation in Blockschälchen im Brutschrank. Die Schnitte breiten sich dabei an der Oberfläche des Mediums aus und zeigen bei älteren Tieren bereits nach 30 min eine mehr oder weniger intensive blauviolette Färbung; das Medium bleibt farblos. Nach Beendigung der Inkubation werden die Schnitte kurz in Aqua dest. gespült, 20 min in neutralem gepuffertem Formol (10%ig) nach Lillie fixiert, auf Objektträger aufgezogen, leicht angetrocknet und in Glycerin-Gelatine eingedeckt.

Das Verfahren ist eine Kombination der von Rutenburg, Wolman und Seligman (1953) bzw. Rosa und Velardo (1954) angegebenen Methoden; es vermeidet nicht — enzymatische Reduktion des Indikators (Tetrazolium-Purpur, identisch mit Neo-Tetrazolium) durch Inkubation in einem weniger alkalischen Milieu (p_H 7,6), das auch für die Wirkung der Aktivatoren günstiger liegt, und verhindert durch Zugabe von Cyanid einen Elektronenverlust über das Cytochromsystem. Das *cyto*chemische Auflösungsvermögen der Reaktion ist relativ gering; da die Schnittdicke von 50 μ ohnehin keine cytochemische Aussage zuläßt und das Augenmerk vor allem auf *histo*chemische Befunde gerichtet ist, fällt dieser Nachteil nicht ins Gewicht. Die relativ hohe Schnittdicke war nötig, um ein Zerfließen oder Zerreißen der Schnitte beim Inkubieren nach Möglichkeit zu vermeiden. Dennoch traten bei fetalen Lebern oftmals stärkere Schnittdehnungen auf, die das Verteilungsmuster zwar nicht veränderten, die Beurteilung der Gesamtaktivität des Schnittes jedoch erschwerten. Im übrigen erfüllt das Verfahren hinsichtlich Spezifität, Proportionalität und *histo*chemischer Ortsrichtigkeit die Voraussetzungen für eine funktionelle Deutung der histochemischen Befunde. Die nachfolgenden Befunde innerhalb bestimmter Altersklassen wurden stets an einer Reihe von Tieren erhoben. Die Beschreibung gilt jeweils für den Befund, der die betreffende Altersklasse charakterisiert und wird durch ein Mikrophotogramm belegt. Quantitative Unterschiede im Fermentgehalt von Lebern gleich alter Tiere sind — soweit sie durch Schätzung der Färbungsintensität im Schnitt zu fassen sind — tabellarisch wiedergegeben. Das Hauptinteresse

gilt qualitativen Änderungen der Fermentverteilung im Ablauf der Entwicklung und beschränkt sich auf solche Befunde, die bereits bei Betrachtung mit schwachem Trockensystem deutlich hervortreten.

Ergebnisse

A. Histochemie der SDH in der Leber von Kaninchen

In der Fetalperiode ist die Leber histochemisch nahezu fermentfrei. Das Parenchym zeigt sehr zarte und diffuse rötliche Tönung durch unspezifische Anfärbung mit gelöstem Monoformazan, dagegen keine blauvioletten Granula, die für den Nachweis des Fermentes charakteristisch sind. Erst am Ende der Tragzeit (Normaldauer nach PREISSECKER 1958: 28—32 Tage) treten bei einzelnen Tieren sehr spärlich blau-violette Granula in Parenchymarealen auf, vor allem in der Umgebung terminaler und präterminaler Pfortaderäste. Ihre Zahl ist so gering, daß sie nur bei Betrachtung mit starkem Trockensystem als rundliche oder ovoide Partikel von etwa 1—3 μ Durchmesser zu erkennen sind.

Am 1. Lebenstag (Abb. 1) finden sich sehr geringe Fermentmengen in den periportalen Parenchymzonen, die schon bei Lupenbetrachtung als blau-violette Säume hervortreten; das übrige Parenchym zeigt lediglich eine diffuse rötliche Tönung (s. oben).

Eine Woche post partum tritt eine deutliche Zunahme des Fermentgehaltes hervor, vor allem durch Ausdehnung der fermenthaltigen periportalen Parenchymzonen. Der unterschiedliche Fermentgehalt der periportalen und der perivenösen Parenchymzonen ist Ursache des fleckigen Färbungsmusters.

Zwei Wochen post partum (Abb. 2) findet sich eine weitere Zunahme des Fermentgehaltes, vor allem in den gefäßnahen periportalen Parenchymzonen; die portalen Gefäße sind von einem blau-violetten Saum umgeben und treten dadurch deutlich hervor.

Drei Wochen post partum (Abb. 3) sind die periportalen Parenchymzonen als fermentreiche tiefblaue Säume bereits mit bloßem Auge zu erkennen; die relativ breiten perivenösen Parenchymzonen sind dagegen auffallend fermentarm.

Vier Wochen post partum (Abb. 4) erreichen Fermentgehalt und Fermentverteilung einen Status, der dem des ausgewachsenen Tieres nahekommt (Abb. 5). Die periportalen Parenchymzonen sind außerordentlich fermentreich; ihr Fermentgehalt ist in unmittelbarer Nähe der terminalen Pfortaderäste (Interlobularvenen) am größten und sinkt in Richtung auf die Zentralvenen relativ stark ab. Dort, wo terminale Pfortaderäste eng benachbart liegen, konfluieren ihre Fermentsäume; an diesen Stellen tritt die Läppchenzeichnung besonders markant hervor. Ist die Entfernung zwischen benachbarten terminalen Pfortaderästen größer, so sind ihre Fermentsäume durch eine fermentarme Zone getrennt; die vom Fermentsaum markierte Kontur der Läppchen ist dort unterbrochen. Auf diese Weise entsteht ein Muster der Fermentverteilung, welches die spezifische Organstruktur hervorhebt, vor allem durch den Kontrast zwischen fermentreichen periportalen und fermentarmen perivenösen Parenchymzonen. Dieses Verteilungsmuster bleibt auch im weiteren Verlauf der extrauterinen Entwicklung grundsätzlich gewahrt und ist offenbar artspezifisch.

Tiere gleichen Entwicklungsalters stimmen im Verteilungsmuster des Fermentes grundsätzlich überein; im Fermentgehalt können sie geringfügig differieren (s. Tabelle 1).

Die Zunahme des Fermentgehaltes im Ablauf der Entwicklung ist Tabelle 1 zu entnehmen. Die Angaben über den Fermentgehalt (0 = fehlend; + — Spuren, + ⊦ — gering, + ⊦ + — mäßig, + + + + = reichlich) beruhen auf Schätzungen der Formazanmenge im Schnitt.

Tabelle 1. *Fermentgehalt der Kaninchen-Leber in verschiedenen Altersstufen*

Altersstufe	Tier-Nr.	Ferment-gehalt	Durchschnitt
2 Wochen ante partum	K 14	0	
	K 15	0	
	K 16	0	
	K 17	0	
	K 18	0	0
1 Woche ante partum	K 26	0	
	K 27	0	
	K 28	0	
	K 29	0	
	K 30	0	0
1 Tag post partum . .	K 1	⊦	
	K 2	+	
	K 5	⊦	
	K 6	⌐	
	K 7	+	+
1 Woche post partum	K 3	+ +	
	K 4	+ +	
	K 36	⌐ ⊦ +	
	K 37	⌐ + ⌐	+ + bis + + +
2 Wochen post partum	K 8	⌐ + +	
	K 9	⊦ ⊦ +	
	K 10	⊦ ⊦ +	
	K 11	⌐ + +	
	K 40	⊦ ⌐	
	K 41	⊦ ⌐	+ + < + + +
3 Wochen post partum	K 12	⊦ ⊦ ⊦ ⊦	
	K 13	+ ⊦ ⊦ +	
	K 31	⊣ ⊦ + +	
	K 32	⊦ + + ⌐	
	K 33	⊦ + ⊦ ⊦	⌐ ⌐ ⌐ ⊦
4 Wochen post partum	K 22	⌐ + ⌐ +	
	K 23	+ + ⌐ +	
	K 24	+ + + +	
	K 25	⊦ ⊦ + ⊦	
	K 38	⊦ ⊦ + +	+ + + +
	K 39	⊦ ⊦ + ⊦	

Beim *Kaninchen* ergibt sich folgender *Gesamtbefund:* Histochemisch nachweisbare SDH tritt erst wenige Tage ante partum auf; der Fermentgehalt steigt nach der Geburt relativ unvermittelt an und erreicht nach Ablauf von 4 Wochen einen Wert, der demjenigen des erwachsenen Tieres nahekommt.

In der gleichen Zeit wird jenes Muster der Fermentverteilung ausgebildet, das dem erwachsenen Tier eigentümlich und offenbar artspezifisch ist.

Tiere gleichen Alters variieren etwas hinsichtlich des Fermentgehaltes, stimmen jedoch hinsichtlich der Fermentverteilung grundsätzlich überein.

B. Histochemie der SDH in der Leber von Meerschweinchen

In der Fetalperiode ist histochemisch kein Ferment nachzuweisen, abgesehen von ganz vereinzelten und regellos verteilten Formazanpartikeln im Parenchym, die am Ende der Tragzeit (Normaldauer nach Preissecker: 60 Tage) auftreten.

Am 1. Lebenstag (Abb. 6) zeigt sich eine schwache, unregelmäßig fleckige Fermentreaktion in solchen Parenchymbezirken, die präterminalen und terminalen Pfortaderästen anliegen.

Eine Woche post partum (Abb. 7) finden sich relativ schmale, aber intensiv blauviolett gefärbte Fermentsäume in enger Anlehnung an präterminale und

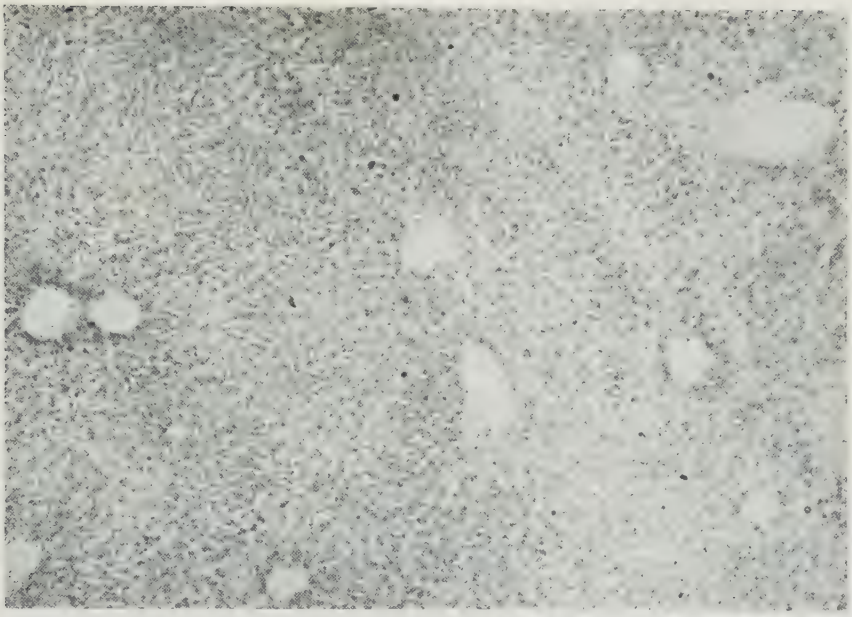


Abb. 1. SDH in der Leber des Kaninchens (1. Lebenstag). (Vergr. 45mal.) Sehr geringe Fermentreaktion in periportalen Parenchymzonen

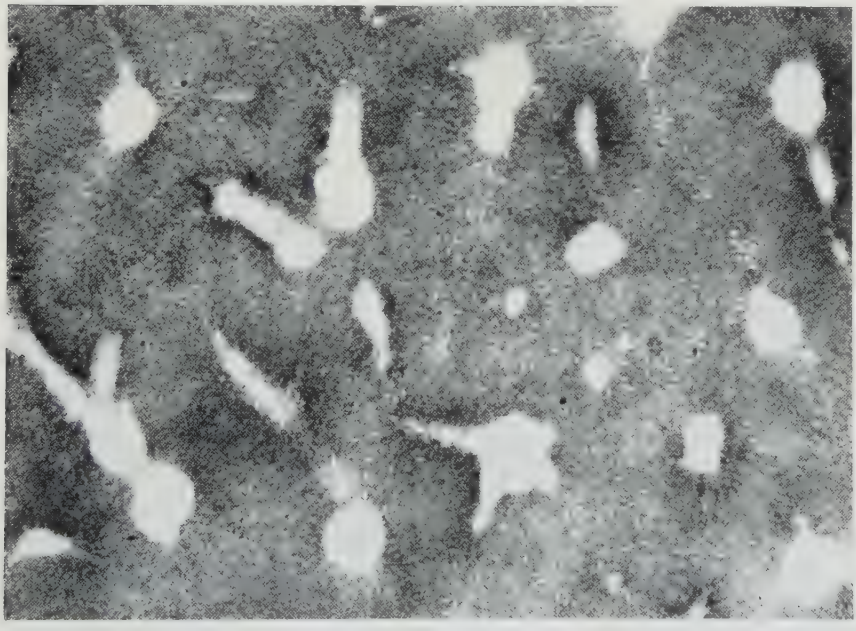


Abb. 2. SDH in der Leber des Kaninchens (2 Wochen post partum). (Vergr. 45mal.) Fermentreiche Parenchymzone um terminale Pfortaderäste, fermentarme Parenchymbezirke um Zentral-, Schalt- und Sammelvenen

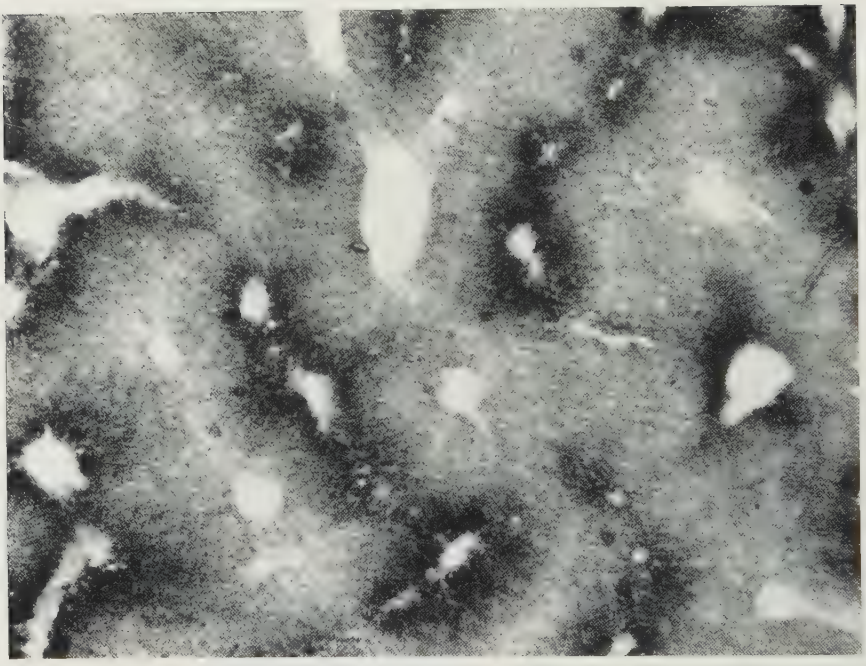


Abb. 3. SDH in der Leber des Kaninchens (3 Wochen post partum). (Vergr. 40mal.) Fermentreiche periportale Parenchymzone, fermentarme perivenöse Bezirke

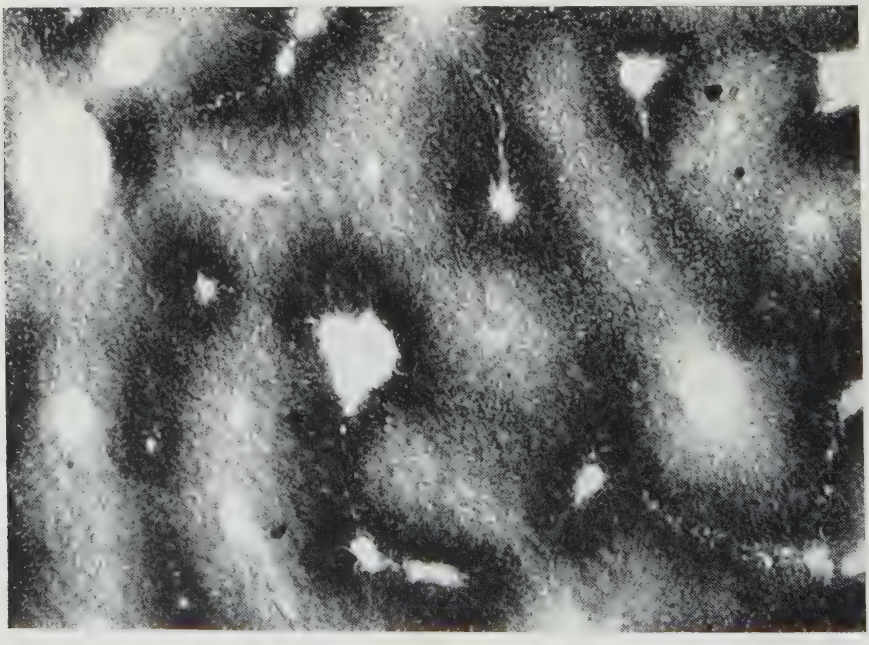


Abb. 4. SDH in der Leber des Kaninchens (4 Wochen post partum). (Vergr. 35mal.) Typisches Verteilungsmuster des Fermentes ähnlich dem beim erwachsenen Tier

terminale Pfortaderäste, die dadurch markant hervortreten; das übrige Parenchym ist relativ fermentarm, vor allem in den perivenösen Bezirken.

Zwei Wochen post partum (Abb. 8) findet sich eine deutliche Verbreiterung und intensive Färbung der periportalen Parenchymzone. An vielen Stellen gehen die Fermentsäume benachbarter terminaler Pfortaderäste ineinander über. Die perivenösen Parenchymbezirke, vor allem in der Umgebung von Zentral- und Sammelvenen, sind auffallend fermentarm; sie zeigen lediglich eine diffuse rötliche Tönung durch Anfärbung mit gelöstem Monoformazan (s. oben).

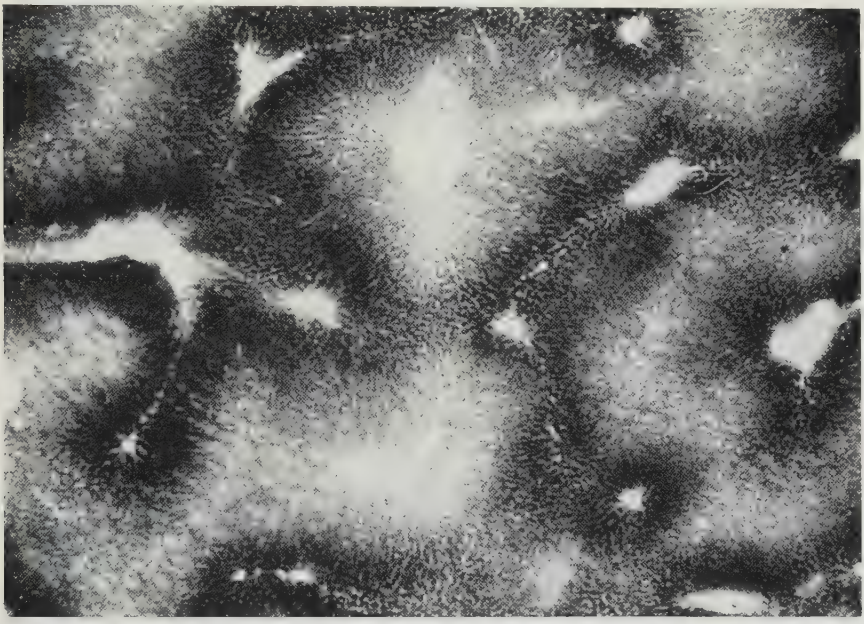


Abb. 5. SDH in der Leber des Kaninchens (erwachsenes Tier). (Vergr. 30mal.) Markierung der Läppchenkontur durch fermentreiche periportale Parenchymzonen

Drei Wochen post partum (Abb. 9) ergibt sich unter Zunahme des Fermentgehaltes ein grundsätzlich ähnlicher Befund, wobei Andeutungen einer Läppchenstruktur hervortreten.

Vier Wochen post partum (Abb. 10) findet sich ein fermentreicher Parenchymsaum in relativ enger Anlehnung an terminale und präterminale Pfortaderäste; die Läppchenstruktur tritt deutlich hervor. Im fermenthaltigen Parenchym treten neben feinen Formazangranula auch gröbere Partikel auf; ihr Durchmesser liegt zwischen 3 und 5 μ.

Fünf Wochen post partum erreichen Fermentgehalt und Fermentverteilung annähernd den Status des erwachsenen Tieres. Die periportalen Parenchymzonen zeigen einen hohen Fermentgehalt, der in Richtung auf die Zentralvenen relativ rasch, aber ungleichmäßig absinkt. Obwohl die Fermentsäume benachbarter Periportalzonen konfluieren, ist die Läppchenkontur weniger markant als beim Kaninchen vergleichbaren Entwicklungsalters; der Befund ist offenbar artspezifisch. Der zeitliche Verlauf der Fermentbildung ist tabellarisch wiedergegeben (Tabelle 2).

Tabelle 2. *Fermentgehalt der Meerschweinchen-Leber in verschiedenen Altersstufen* (Bezeichnung wie in Tabelle 1)

Altersstufe	Tier-Nr.	Fermentgehalt	Durchschnitt
1 Woche ante partum	M 44	0	
	M 45	0	0
1 Tag post partum	M 1	+	
	M 4	0 bis +	
	M 24	+ bis ┌ ┤	
	M 25	+ bis ┌ ┬	
	M 26	+	
	M 46	+	
	M 47	+	+
1 Woche post partum	M 2	++ bis + ┤ ┬	
	M 5	++ bis ++ ┌	
	M 6	┤ +	
	M 10	┤ ┌	
	M 12	++	
	M 14	++	
	M 15	++ bis +++	
	M 48	┌ ┤	
	M 49	++	++ > +++
2 Wochen post partum	M 8	┤ ┤ ┬	
	M 9	┬ + ┤	
	M 16	+ ┌ ┤	
	M 17	┤ ┌ ┬	
	M 18	┤ ┬ + ┌	
	M 50	+ ┬ ┬ ┤	
	M 52	++ bis +++	+++
3 Wochen post partum	M 22	+++	
	M 23	┤ ┌ ┌ +	
	M 30	+ ┌ ┤ ┬	
	M 31	++ bis ┬ ┬ ┌	
	M 40	+++	
	M 41	+++ bis + + ┤+	+ ┤+ > ++++
4 Wochen post partum	M 27	+++ bis ┬ ┬ + ┌	
	M 35	┬ ++ bis + ┌ ┌ ┤	
	M 36	+++ bis ┌ ┤ ┌ ┤	
	M 37	+ ┤+ bis ┌ ┤ ┌ ┌	
	M 38	+++	
	M 39	+ + ┤+	++ ┤bis ++++
5 Wochen post partum	M 32	++++	
	M 33	++++	
	M 34	++++	
	M 53	++++	++++

Beim *Meerschweinchen* ergibt sich folgender *Gesamtbefund:*

Histochemisch nachweisbare SDH tritt erst unmittelbar post partum auf; der Fermentgehalt steigt innerhalb von 4 Wochen nach der Geburt relativ stetig an und erreicht nach Ablauf von 5 Wochen einen Wert, der demjenigen des erwachsenen Tieres nahekommt. In der gleichen Zeit bildet sich jenes Muster der Fermentverteilung aus, das dem erwachsener Tiere eigentümlich und offenbar artspezifisch ist. Tiere gleichen Alters variieren etwas hinsichtlich der Fermentmenge, stimmen jedoch hinsichtlich der Fermentverteilung grundsätzlich überein.

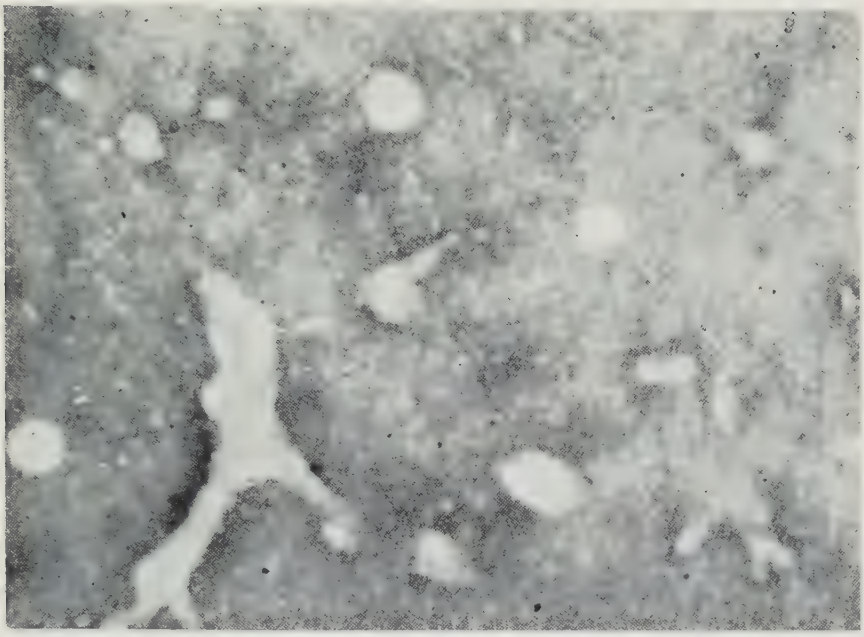


Abb. 6. SDH in der Leber des Meerschweinchens (1. Lebenstag). (Vergr. 55mal.) Geringe Fermentreaktion in periportalen Parenchymbezirken

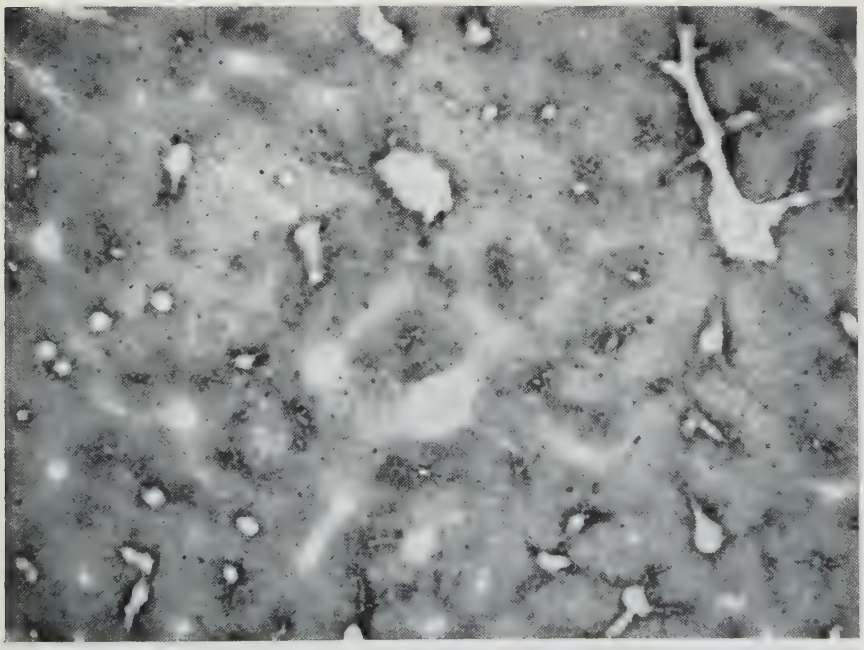


Abb. 7. SDH in der Leber des Meerschweinchens (1 Woche post partum). (Vergr. 20mal.) Sehr markante Fermentreaktion in einer schmalen periportalen Parenchymzone

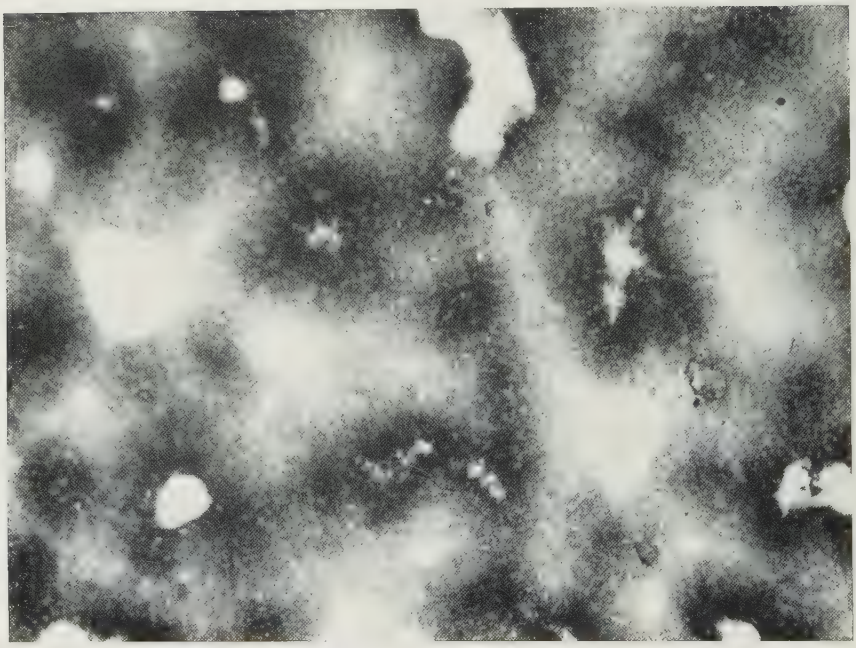


Abb. 8. SDH in der Leber des Meerschweinchens (2 Wochen post partum). (Vergr. 55mal.) Vermehrung und Ausbreitung des Fermentes im periportalen Parenchym

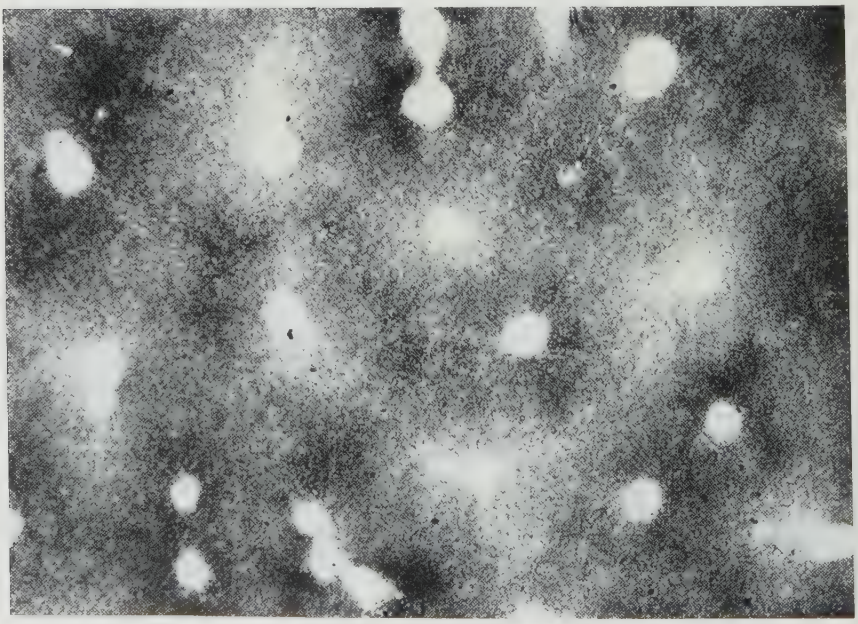


Abb. 9. SDH in der Leber des Meerschweinchens (3 Wochen post partum). (Vergr. 50mal.) Zunahme des Fermentgehaltes im periportalen Parenchym; Andeutung einer Läppchenstruktur

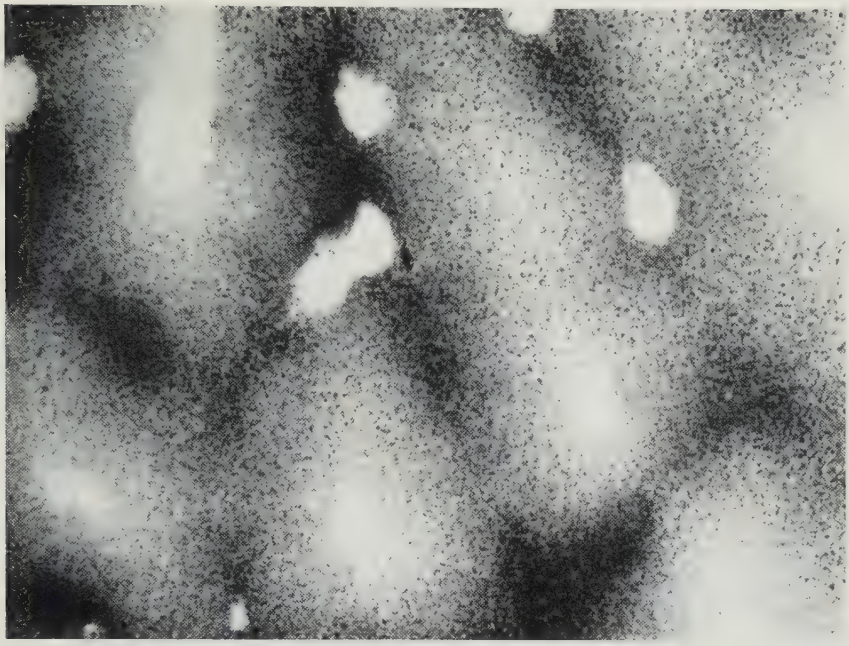


Abb. 10. SDH in der Leber des Meerschweinchens (4 Wochen post partum). (Vergr. 65mal.) Schmale fermentreiche Parenchymzone in der Läppchenperipherie; deutliche Läppchenkontur

C. Histochemie der SDH in der Leber von Ratten

In der Fetalperiode ist histochemisch kein Ferment nachzuweisen. Das gesamte Leberparenchym zeigt lediglich eine diffus rötliche Tönung, vereinzelt auch rötliche Tröpfchen, die irregulär über den Schnitt verteilt und als Artefakte anzusehen sind.

Am 1. Lebenstag (Abb. 11) findet sich bei den meisten Tieren eine schwache, aber deutliche Fermentreaktion in unscharf begrenzten Parenchymarealen, vor allem in der Umgebung portaler Gefäße.

Eine Woche post partum (Abb. 12) kommt es in Anlehnung an präterminale und terminale Pfortaderäste zu einer weiteren Zunahme des Fermentgehaltes im Parenchym; die perivenösen Parenchymareale sind relativ fermentarm.

Zwei Wochen post partum (Abb. 13) kommt es zu einer starken Zunahme des Fermentgehaltes in weiter Anlehnung an terminale Pfortaderäste; der Kontrast zwischen fermentreichen und fermentarmen (perivenösen) Parenchymbezirken wird dadurch verstärkt.

Drei Wochen post partum (Abb. 14) wird unter weiterem Anstieg der Fermentkonzentration ein Verteilungsmuster erreicht, das sich im späteren Verlauf der Entwicklung nur geringfügig ändert und dem des erwachsenen Tieres entspricht. Der Fermentgehalt der periportalen Parenchymbezirke ist hoch und sinkt gegen die Zentralvenen zu relativ stark ab. Die fermentreichen Zonen um benachbarte Pfortaderäste konfluieren vielfach; auf diese Weise entstehen Andeutungen einer unregelmäßigen Läppchenstruktur, die weniger hervortritt als beim Meerschweinchen oder gar beim Kaninchen.

Tabelle 3. *Fermentgehalt der Ratten-Leber in verschiedenen Altersstufen*

Altersstufe	Tier-Nr.	Fermentgehalt	Durchschnitt
3. Fetalwoche	R 25	0	
	R 26	0	
	R 27	0	
	R 28	0	0
1. Lebenstag	R 21	0 bis +	
	R 22	+	
	R 23	+	
	R 24	0 bis +	+>0
1 Woche post partum	R 11	++	
	R 12	++	
	R 13	++ bis +++	
	R 14	++ bis +++	
	R 15	++	
	R 30	+ bis ++	
	R 31	+ bis ++	++
2 Wochen post partum	R 6	+++	
	R 7	+++	
	R 8	+++	
	R 9	+++	
	R 10	+++	
	R 32	+++	
	R 33	+++	+++
3 Wochen post partum	R 16	++++	
	R 17	++++	
	R 18	++++	
	R 19	++++	
	R 20	+++ bis ++++	++++

Der zeitliche Verlauf der Fermentbildung ist in Tabelle 3 dargestellt.

Bei der *Ratte* ergibt sich folgender *Gesamtbefund:* Histochemisch nachweisbare SDH tritt erst unmittelbar post partum auf; der Fermentgehalt steigt innerhalb von 3 Wochen relativ stetig an und erreicht in der 4. Woche einen Wert, der demjenigen erwachsener Tiere nahekommt. Bis zum Beginn der 4. Woche post partum wird jenes Verteilungsmuster ausgebildet, das für erwachsene Tiere charakteristisch und offenbar artspezifisch ist.

Auf Grund der histochemischen Befunde stimmen *alle 3 Nager* (Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte) hinsichtlich der zeitlichen und quantitativen Ausbildung ihres Fermentbestandes weitgehend überein (s. Tabelle 4).

Tabelle 4. *Durchschnittlicher Fermentgehalt der Leber von Kaninchen, Meerschweinchen und Ratte in gleichen Altersstufen*

Altersstufe	Kaninchen	Meerschweinchen	Ratte
ante partum	0	0	0
1 Tag post partum	+	+	0<+
1 Woche post partum	++ bis +++	++>+++	++
2 Wochen post partum	+++>++	+++	+++
3 Wochen post partum	++++	+++ > ++++	+++
4 Wochen post partum	+++++	+++ bis ++++	+++
5 Wochen post partum	+++++	++++	+++

Bei allen 3 Arten tritt histochemisch nachweisbares Ferment erst unmittelbar post partum auf und erreicht innerhalb von 3—5 Wochen eine Konzentration, die derjenigen beim erwachsenen Tier nahekommt. Während der gleichen Zeit wird bei allen 3 Arten ein histochemisches Verteilungsmuster ausgebildet, das im Verteilungsprinzip (periportales Konzentrationsmaximum, perivenöses Konzentrationsminimum) übereinstimmt und lediglich mit der Strombahngliederung der einzelnen Arten in charakteristischer Weise variiert.

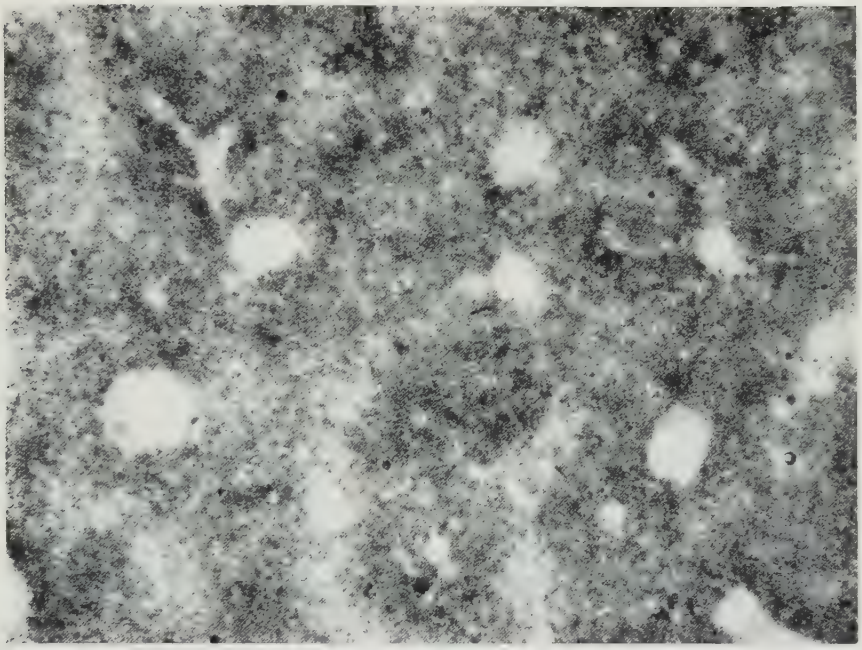


Abb. 11. SDH in der Leber der Ratte (1. Lebenstag). (Vergr. 50mal.) Geringe Fermentreaktion in größeren periportalen Parenchymarealen

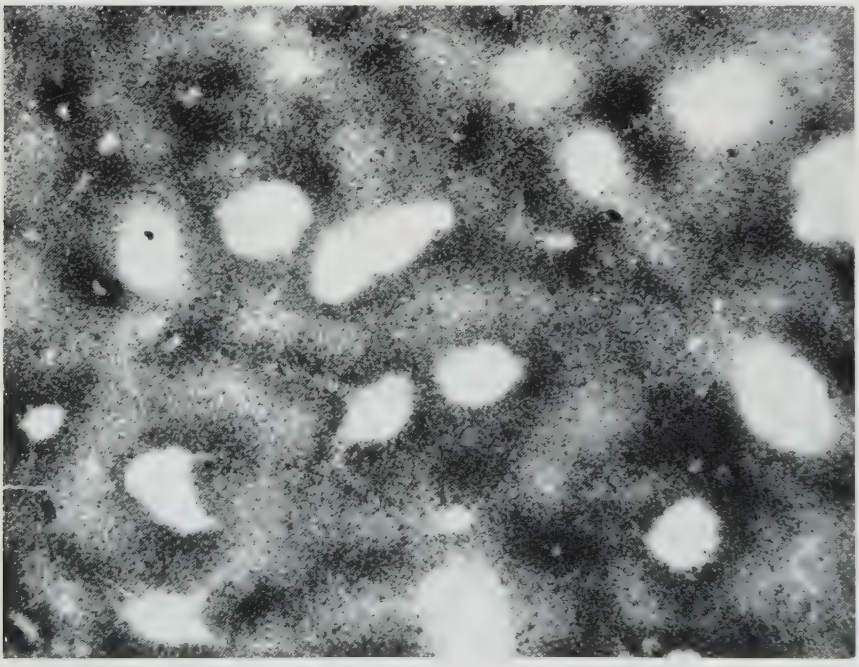


Abb. 12. SDH in der Leber der Ratte (1 Woche post partum). (Vergr. 65mal.) Fermentzunahme in größeren und kleineren periportalen Parenchymbezirken

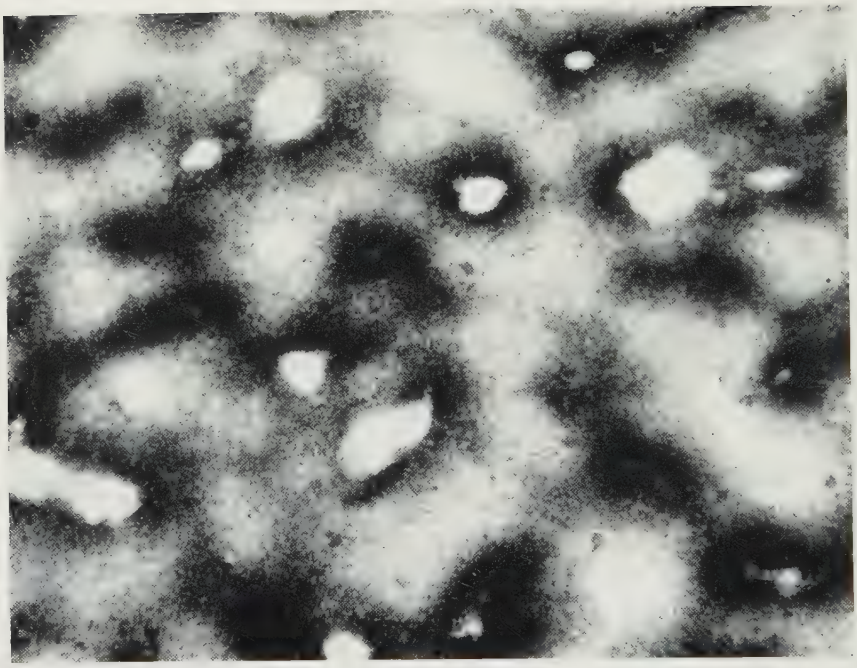


Abb. 13. SDH in der Leber der Ratte (2 Wochen post partum). (Vergr. 55mal.) Starke Fermentreaktion in periportalen Parenchymbezirken; keine markante Läppchenstruktur

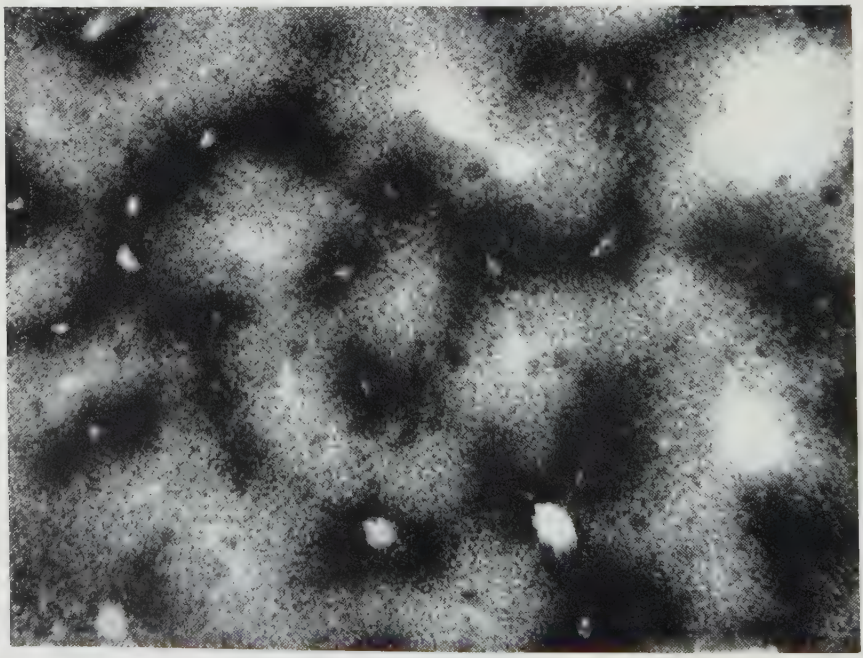


Abb. 14. SDH in der Leber der Ratte (3 Wochen post partum). (Vergr. 70mal.) Konzentration und Verteilung des Fermentes ähnlich wie beim erwachsenen Tier

Das kausale und formale Prinzip, das den histochemischen Befunden zugrunde liegt, wird im folgenden Abschnitt an Hand des Schrifttums diskutiert.

Diskussion

Die histochemischen Befunde stimmen hinsichtlich der zeitlichen und quantitativen Entwicklung des Fermentbestandes weitgehend mit biochemischen Befunden an Leberhomogenaten überein. Bei allen bisher untersuchten Säugern ist die Fermentkonzentration (SDH) während der Fetalperiode außerordentlich gering; sie steigt bei Meerschweinchen (Flexner, Belknap u. Flexner 1953) und Ratten (Potter, Schneider u. Liebl 1945) kurz ante partum nur geringfügig an, erreicht dann aber innerhalb weniger Wochen post partum einen Wert, der dem des erwachsenen Tieres entspricht. Histochemische und biochemische Fermentaktivität gehen einander parallel; die Proportionalität des histochemischen Nachweises ist damit erwiesen. Da die Sensibilität des Nachweises relativ gering ist, liegen die niedrigen Fermentkonzentrationen der Fetalperiode jenseits der Erfassungsgrenze. Dem Auftreten der Bernsteinsäuredehydrogenase in der Leber und ihrer Vermehrung unmittelbar post partum gehen ähnliche Vorgänge an anderen Fermenten parallel, die mit der SDH sowohl funktionell als auch strukturell besonders eng verknüpft sind. So zeigen vor allem jene Fermente, die für die Energiebildung und Energienutzung der Zelle von Bedeutung sind, nämlich Cytochromoxydase und Adenosin-Triphosphatase, einen analogen Konzentrationsanstieg nach der Geburt (Flexner 1955; Flexner u. Hellermann 1955; Flexner, Belknap u. Flexner 1953; Potter, Schneider u. Liebl 1945).

Der unvermittelte Konzentrationsanstieg dieser Fermente steht offensichtlich in Zusammenhang mit dem abrupten Milieuwechsel vom intra- zum extrauterinen Leben. Diesem Milieuwechsel entspricht ein Wechsel in der Energielieferung der Zelle. Während der junge Embryo seinen Energiebedarf überwiegend aus der Glykolyse deckt, erfolgt später die Energielieferung in zunehmendem Maße aus der Atmung, die bereits in utero eingeleitet wird und post partum sehr bald dominiert (Duspiva 1955). Dieser Wechsel vollzieht sich bei allen Wirbeltieren, besonders markant zum Zeitpunkt der Geburt; er läßt sich an Hand der Atmungsgröße und der (Atmungs-)Enzymaktivität der fetalen Organe unmittelbar verfolgen und graphisch als Exponentialfunktion des Wachstums darstellen. Das ungestörte Wachstum entspricht einer Exponentialgleichung von der Form $y = a \cdot e^{kt}$. Für die graphische Darstellung wird meist die Schreibart $\log y = \log a + kt \log e$ gewählt. Diese Gleichung besagt, daß eine gerade Linie resultiert, wenn der Logarithmus der wachsenden Einheit gegen die Zeit aufgetragen wird. Als wachsende Einheit kann eine Länge, ein Gewicht oder eine biochemische Größe eingesetzt werden (Duspiva 1955). Auch die Atmung folgt dieser Gleichung; die Atmungsgröße steigt exponentiell mit dem Entwicklungsalter der Feten an. Das gleiche gilt von der Aktivität der Cytochromoxydase und der Bernsteinsäuredehydrogenase. Die Kurven der Atmungsgröße und der Enzymaktivität stimmen nahezu überein; insbesondere ist die Wachstumskonstante der Bernsteinsäuredehydrogenase fast identisch mit der Atmung des Embryos (Boell 1946). Da Atmungsgröße und (Atmungs-)Enzymaktivität demnach korreliert sind, ist die biochemisch darstellbare Enzymaktivität ein Abbild der Atmungsgröße der betreffenden Gewebsformation. In dieser Korrelation, die auch nach der Onto-

genese gewahrt bleibt, liegt der besondere Informationswert des histochemischen SDH-Nachweises im Rahmen unserer Fragestellung.

Die Ursache für die Entwicklung der respiratorischen Aktivität ist offenbar weniger das Wachstum als die Differenzierung der Organe. Beide Vorgänge, die in zeitlichem Wechsel die Entwicklung leiten, sind durch unterschiedliche biochemische Leistungen gekennzeichnet, die auch im Fermentbestand hervortreten. Legt man biochemische Kriterien zugrunde, so ist die Entwicklung der respiratorischen Aktivität (kenntlich am Anstieg der Atmungsgröße und der Atmungsferment-Aktivität) mehr der Differenzierung als dem Wachstum zugeordnet. Nur unter diesem Aspekt wird der abrupte Anstieg von Atmungsgröße und Fermentaktivität verständlich, der sogleich nach der Geburt einsetzt und keinesfalls den morphologisch kenntlichen Entwicklungsphänomenen parallel geht. Der Anstieg der respiratorischen Aktivität, der in den einzelnen Organen zeitlich differieren kann, steht in enger Beziehung zur spezifischen Organfunktion.

Besonders aufschlußreich sind in diesem Zusammenhang Untersuchungen über die Fermentaktivität der Herzmuskulatur in verschiedenen Phasen der intra- und extrauterinen Entwicklung. Bei Hühnerembryonen steigt der Fermentgehalt des Myokards (Adenylpyrophosphatase, SDH) weniger mit dem Wachstum und der morphologischen Differenzierung der Myokardfasern als mit deren funktioneller Belastung an (Moog 1947; Sippel 1954), besonders deutlich wird diese Beziehung im Beginn der intrauterinen Herzaktion (Sippel 1954). Für Ratten gelten analoge Bedingungen; die Fermentaktivität (SDH) steigt während der Fetalzeit in 2 Phasen an, die nicht dem Wachstum, sondern der Funktion des Myokards korreliert sind. Ein weiterer Aktivitätsanstieg folgt unmittelbar post partum, unabhängig von der Wachstumsgröße des Myokards (Sippel 1954), er steht in unmittelbarem Zusammenhang mit der akuten Belastung des Myokards durch die postfetale Kreislaufumstellung. Der stärkeren funktionellen Belastung der Ventrikel entspricht zugleich ein relativ hoher Fermentgehalt ihrer Muskelfasern; die weniger belasteten Myokardfasern der Vorhöfe sind deutlich fermentärmer (Cooper 1955). Am Ende der postfetalen Entwicklung entspricht der Fermentgehalt der einzelnen Herzabschnitte ihrer jeweiligen funktionellen Belastung; Enzymaktivität und biologische Funktion sind demnach topographisch eng korreliert. An diesem Befund ist bemerkenswert, daß die Enzymaktivität auch innerhalb eines histologisch homogenen Parenchyms mit der unterschiedlichen funktionellen Belastung der einzelnen Parenchymbezirke planmäßig variiert! Ähnliche Beziehungen zwischen enzymatischer und funktioneller Aktivität wurden von Potter, Schneider u. Liebl (1945; SDH, Cytochromoxydase, Adenosintriphosphatase) sowie von Flexner u. Mitarb. (1955; SDH, Cytochromoxydase, Adenosintriphosphatase, Apyrase) im Ablauf der Gehirnentwicklung bei Ratten nachgewiesen. Aus allen bisher mitgeteilten Beobachtungen über die Ontogenese von Atmungsfermenten bei Säugern lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die Entwicklung der respiratorischen Aktivität der Organe beginnt bereits in utero; sie steigt ante partum nur geringfügig, post partum dagegen relativ stark an und erreicht bei Nagern innerhalb weniger Wochen einen Reifungsgrad, der dem des erwachsenen Tieres annähernd entspricht.

2. Die Entwicklung der respiratorischen Aktivität ist mehr der funktionellen als der morphologischen Differenzierung der Organe zugeordnet.

3. Die Atmungsferment-Aktivität (SDH, Cytochromoxydase) geht der Atmungsgröße (Sauerstoffverbrauch) der einzelnen Organe oder Organbezirke parallel; sie ist im Verlauf der Ontogenese ein Abbild der funktionellen Reife der betreffenden Organe oder Organbezirke.

4. Die Entwicklung der respiratorischen Aktivität stimmt bei allen Säugern im Prinzip überein, sie variiert jedoch mit dem unterschiedlichen Reifungstempo der einzelnen Organe und Organbezirke.

Die Kenntnis dieser Beziehungen, die der Reifung der respiratorischen Aktivität ganz allgemein zugrunde liegen, ist Voraussetzung für die funktionelle Deutung der eigenen histochemischen Befunde am Leberparenchym.

Die späte Entwicklung der respiratorischen Aktivität, ihr sprunghaftes Ansteigen nach der Geburt, sind offenbar Ausdruck jener umfassenden Funktionssteigerung, die auch andere Organe betrifft und die innerhalb weniger Wochen die Anpassung an das extrauterine Leben vollzieht. Als spezifischer Reiz, der die Enzymbildung im Leberparenchym aktiviert, kommt vor allem der Übergang von der parenteralen zur enteralen Ernährung in Betracht. Die Verarbeitung der im Darm resorbierten und mit dem Pfortaderblut zugeführten Nahrungsbestandteile belastet in hohem Maße die Ingestivfunktion (Bolck 1960), die Entgiftung und Eliminierung schädlicher Metabolite ebenso wie die Gallebildung die Digestivfunktion des Leberparenchyms. Bei der Vielfalt der Organfunktionen (Anabolismus, Katabolismus, Resorption, Sekretion, Exkretion, Kreislaufregulation u. a.) ist es nicht möglich, jene Faktoren anzugeben, welche die respiratorische Aktivität unmittelbar stimulieren. Im Rahmen unserer Untersuchung genügt die Feststellung, daß die Enzymbildung (SDH) im Leberparenchym mit der funktionellen Belastung des Organs beim Übergang vom intra- zum extrauterinen Leben sprunghaft ansteigt.

Die histochemischen Befunde sind ein Abbild jener Funktionssteigerung. Ihr besonderer Informationswert liegt jedoch weniger in der zeitlich korrekten Wiedergabe jener Funktionssteigerung als in der Möglichkeit, die Reifung der respiratorischen Aktivität am strukturell intakten Gewebe verfolgen zu können. Nach den histochemischen Befunden zeigt die Reifung der respiratorischen Aktivität in allen Altersstufen enge topographische Beziehungen zur morphologischen Reifung des Organparenchyms. In der Fetalperiode bildet das Leberparenchym zunächst eine kontinuierliche Zellmasse, die sich später in einschichtige Parenchymplatten gliedert (Elias 1949). Die Parenchymplatten, welche vielfältig miteinander kommunizieren und von zylindrischen Lakunen (Leberlabyrinth nach Elias u. Bengelsdorf 1949) durchzogen werden, verlaufen zunächst relativ ungeordnet in allen Richtungen des Raumes. Zu diesem Zeitpunkt fehlt daher eine Läppchenstruktur. Sie wird erst nach der Geburt ausgebildet, offenbar unter der Wirkung des Pleurasoges, der mit der Atmung einsetzt und sich über die Hohlvene auf die Lebervenen fortsetzt. Durch die Sogwirkung der Lebervenen werden jene Blutsinus bevorzugt durchströmt, die den geringsten Strömungswiderstand bieten; sie liegen durchweg radiär zur Zentralvene. Die strömungsdynamisch weniger günstigen Sinusoide verkümmern allmählich (Pfuhl 1932). Auf diese Weise bildet sich unter dem Einfluß der gegen die Zentralvenen konvergierenden Strömung die eigentliche Läppchenstruktur heraus. Die radiäre Ausrichtung der Sinusoide und der sie begrenzenden Parenchymplatten wird

demnach von der Durchströmung des Organs reguliert und tritt erst nach der Geburt hervor, sobald der Pleurasog wirksam werden kann. Die Fermentverteilung im Leberparenchym ist Abbild seiner morphologischen Reife. So finden sich die geringen Fermentmengen der fetalen Leber regellos über das noch ungegliederte Parenchym verteilt. Im gleichen Maße, wie die strukturelle Gliederung des Parenchyms in Läppchen voranschreitet, bildet sich jenes Muster der Fermentverteilung, das für die betreffende Art charakteristisch ist. Dabei stimmen die einzelnen Arten im Verteilungsprinzip des Fermentes grundsätzlich überein. Die Fermentkonzentration (SDH) ist stets in jenen Parenchymzonen am größten, die den Portalfeldern benachbart sind; von dort sinkt sie in Richtung auf die Zentral- und Sublobularvenen mehr oder weniger stark ab. Dieser Befund variiert lediglich mit dem Entwicklungsalter und mit dem Läppchentypus der betreffenden Art. Die Beziehungen zwischen Läppchenstruktur und Fermentverteilung lassen sich bei Kaninchen relativ gut überblicken (s. Abb. 5). Beim erwachsenen Tier bildet das fermentreiche Parenchym einen dunklen Saum um terminale und präterminale Pfortaderäste; die Läppchenkontur wird dadurch hervorgehoben, obwohl der fermentreiche Saum mehrfach durch fermentarme „Lücken" unterbrochen ist. Derartige Lücken liegen dort, wo die benachbarten Endäste der Pfortader weiter auseinander liegen. Grundsätzlich ähnliche Beziehungen finden sich beim Meerschweinchen (s. Abb. 10) und bei der Ratte (s. Abb. 14); auch bei diesen Arten ist die Fermentkonzentration im periportalen Parenchym am größten und im perivenösen am geringsten. Die Läppchenstruktur ist bei diesen Arten jedoch weniger deutlich ausgeprägt als beim Kaninchen. Sucht man nach dem formalen Prinzip, das der Fermentverteilung zugrunde liegt, so ergeben sich enge Beziehungen zur Gliederung der terminalen Strombahn, insbesondere zur Ausdehnung der vasculären Grenzscheiden in der Läppchenperipherie. Die vasculäre Grenzscheide (Pfuhl 1932) ist ein flächenhaft ausgebreitetes Netz von Capillaren, das von Endästen der Pfortader und der Leberarterie gespeist wird und die einzelnen Läppchen mehr oder weniger vollständig umhüllt. Die Ausdehnung und Form der vasculären Grenzscheide bestimmt sowohl die morphologische als auch die funktionelle Gliederung des Organparenchyms der einzelnen Säugerarten. Die Beziehung läßt sich an wenigen Beispielen aus der vergleichenden Morphologie und Histochemie der Säugerleber demonstrieren (Abb. 15—17). Die größte Ausdehnung erreicht die vasculäre Grenzscheide beim *Schwein*; sie umgibt jedes Läppchen mit einem geschlossenen Kapillarnetz. Die fermentreiche Parenchymzone bildet einen kontinuierlichen dunklen Saum in der Läppchenperipherie, dessen Dichte gegen die Zentralvene annähernd konzentrisch absinkt (Abb. 15).

Beim Pferd ist die vaskuläre Grenzscheide weniger ausgedehnt als beim Schwein, vor allem dort, wo Sammelläppchen einander berühren. An diesen Stellen zeigt auch der Fermentsaum Unterbrechungen seiner Kontinuität (Abb. 16).

Schließlich gibt es Arten, deren vaskuläre Grenzscheide sich mehr oder weniger auf die Läppchenkanten beschränkt, wie etwa beim Rind. Dort ist die fermentreiche Parenchymzone in gleicher Weise unterbrochen und auf die Läppchenkanten beschränkt (Abb. 17). Alle Säugerlebern lassen sich einem der 3 Typen zuordnen, wenn man von geringfügigen Abweichungen absieht. Der Verteilungstyp der Leber des Kaninchens ähnelt dem des Pferdes, jener der Leber von Meerschweinchen und Ratte dem des Rindes.

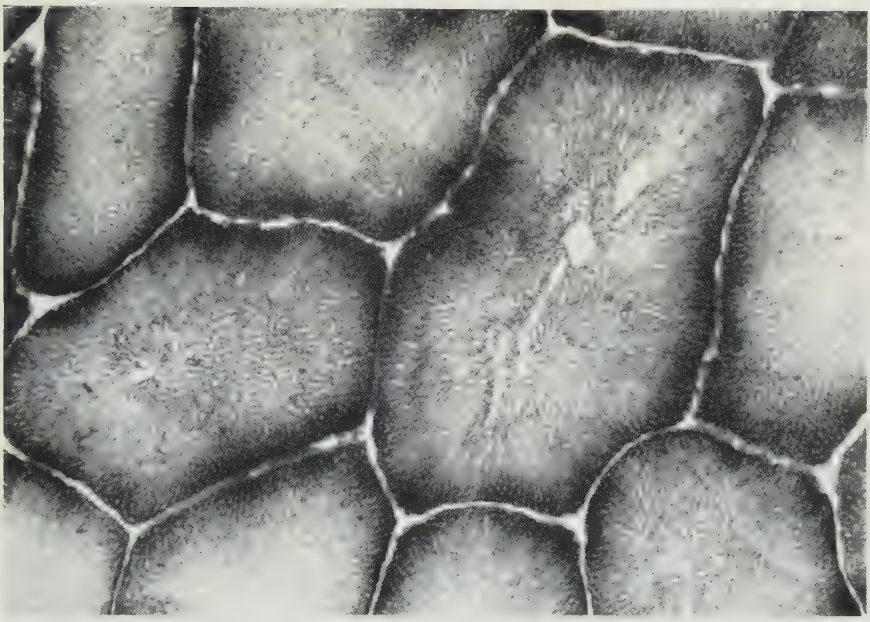


Abb. 15. SDH in der Leber des Schweines (Vergr. 20mal). Kontinuierlicher Fermentsaum in der Läppchenperipherie

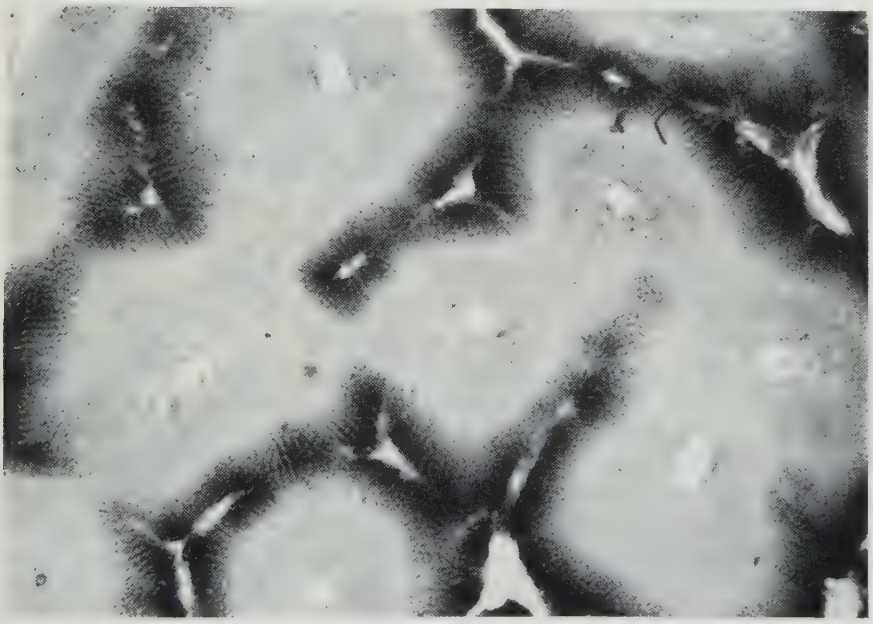


Abb. 16. SDH in der Leber des Pferdes. (Vergr. 30mal.) Diskontinuierlicher Fermentsaum in der Läppchenperipherie, vor allem an Kontaktflächen von Sammelläppchen

Da anzunehmen ist, daß Parenchymzonen mit einheitlicher Enzymausstattung funktionell übereinstimmen, liefern die histochemischen Befunde eine Basis für die Klärung der funktionellen Gliederung des Leberparenchyms. Prüft man nun

an Hand dieser Befunde erneut die Frage, welcher Teil des Parenchyms als Funktionselement des Organs gelten kann, das klassische hexagonale Läppchen (Kiernan 1932) oder das sog. portale Läppchen (Mall 1953), so findet das Konzept des *portalen Läppchens* in den vorliegenden histochemischen Befunden eine wesentliche Stütze. Als portales Läppchen bezeichnet Mall jenen Parenchymanteil, der vom gleichen terminalen Pfortader- und Arterienast gespeist und von den Zentralvenen der umliegenden „klassischen" Läppchen drainiert wird. Auf Querschnitten hat dieser Parenchymbezirk die Form eines Dreieckes, dessen

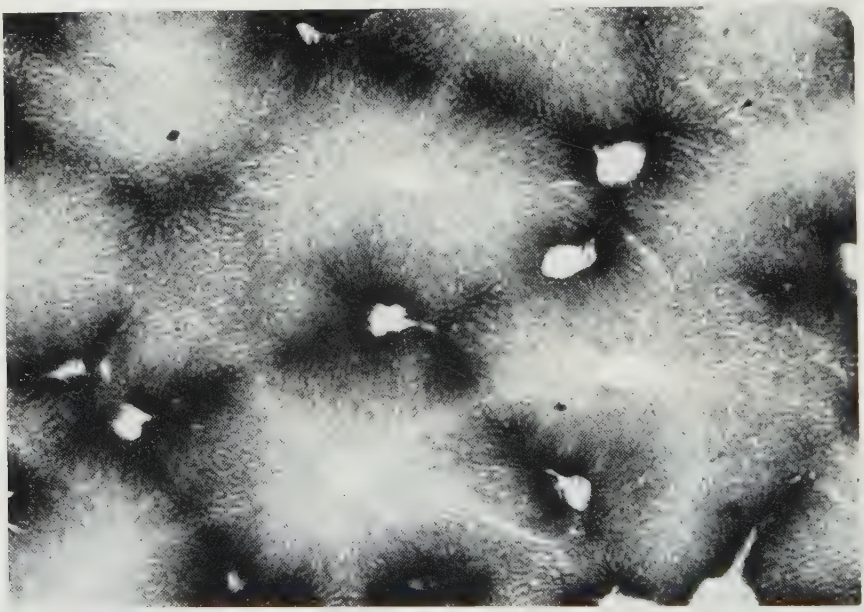


Abb. 17. SDH in der Leber des Rindes. (Vergr. 35mal.) Regelmäßige Lichtung des Fermentsaumes in der Mitte der Läppchenseiten

Ecken durch die Zentralvenen der 3 umliegenden hexagonalen Läppchen gebildet werden (Abb. 18). Dort, wo sich die Grenzen des portalen und des klassischen Läppchens schneiden, liegen die sog. Nodalpunkte (Mall 1953). An diesen Punkten, die vom versorgenden Portalfeld annähernd ebensoweit entfernt sind wie die Zentralvenen, treffen die Strömungen benachbarter Portalfelder derart aufeinander, daß eine verlangsamte Strömung resultiert. Die Nodalpunkte gleichen somit strömungsdynamisch und auch funktionell der Region um die Zentralvenen. Diese funktionelle Übereinstimmung tritt auch in den histochemischen Befunden hervor; die Fermentausstattung der Nodalpunkte stimmt durchweg mit derjenigen der („klassischen") Läppchenzentren überein (Schumacher 1957). Besonders eindrucksvoll tritt diese funktionelle Übereinstimmung unter pathologischen Bedingungen hervor (Rappaport 1959), vor allem bei den verschiedenen Formen der Hypoxydose (Strughold 1944). Die resultierenden Parenchymschäden sind beim Menschen und bei den meisten Versuchstieren durchaus nicht streng konzentrisch um die Zentralvene angeordnet, sondern dehnen sich exzentrisch in Richtung auf die Nodalpunkte aus und können auf

diesem Wege konfluieren. Auf diese Weise entstehen die sog. Stauungsstraßen, welche bei chronischer Stauungshyperämie benachbarte („klassische") Läppchenzentren miteinander verbinden. Analoge Verteilungsmuster finden sich bei zahlreichen anderen Parenchymschäden (Rappaport u. Hiraki 1958). Die auffallende Übereinstimmung zwischen der Enzymaktivität und der Vulnerabilität verschiedener Läppchenareale liefert eine Handhabe für die Klärung der kausalen Beziehung, die der Fermentverteilung zugrunde liegt. Topographisch nimmt die Enzymkonzentration (SDH und Cytochromoxydase) in gleichem Maße ab, wie die Vulnerabilität gegenüber dem Sauerstoffmangel ansteigt. Auf Grund der oben genannten Beziehungen zwischen Atmungsgröße und Atmungsferment-Aktivität (SDH, Cytochromoxydase) ist anzunehmen, daß die Dichte der Bernsteinsäuredehydrogenase der Atmungsgröße der betreffenden Parenchymareale entspricht. Demnach wäre die Atmungsintensität in der Läppchenperipherie am größten und fiele in Richtung auf das Läppchenzentrum ab. Da andererseits die Sauerstoffspannung des Läppchenblutes in der Läppchenperipherie am größten ist, wäre es möglich, in der Übereinstimmung von Sauerstoffspannung und Enzymaktivität (SDH, Cytochromoxydase) eine Anpassung der Atmungsgröße an die Sauerstoffspannung der betreffenden Parenchymareale zu sehen. Eine solche Vermutung wird nicht nur durch biochemische Relationen sondern auch durch die topographische Übereinstimmung von Sauerstoffmangel-Resistenz (maximal in der Läppchenperipherie) und Sauerstoffspannung nahegelegt. Daß zwischen Sauerstoffspannung des Läppchenblutes und Atmungsfermentaktivität unmittelbare Beziehungen bestehen, wird ferner durch Untersuchungen über die Wirkung einer protrahierten anämischen Hypoxydose auf die Enzymaktivität der Leber belegt (Schumacher 1959); in dem gleichen Maße, wie die Sauerstoffspannung des Läppchenblutes absinkt, vermindert sich die SDH-Aktivität des Leberparenchyms. Obwohl die kausalen Beziehungen zwischen Enzymaktivität und Sauerstoffspannung im einzelnen noch unbekannt sind, rechtfertigen die vorliegenden Befunde die Vermutung, daß die Fermentausstattung der einzelnen Parenchymareale planmäßig mit deren Sauerstoffspannung variiert. Während die Konzentration der SDH und der Cytochromoxydase der Sauerstoffspannung parallel geht, zeigen die DPN- und die TPN-Diaphorase ein reziprokes Verhalten; die Konzentration beider Fermente steigt mit fallender Sauerstoffspannung an und erreicht im Läppchenzentrum ihr Maximum (Schumacher 1957). Die histochemischen Verteilungsmuster beider Fermentgruppen verhalten sich wie Positiv

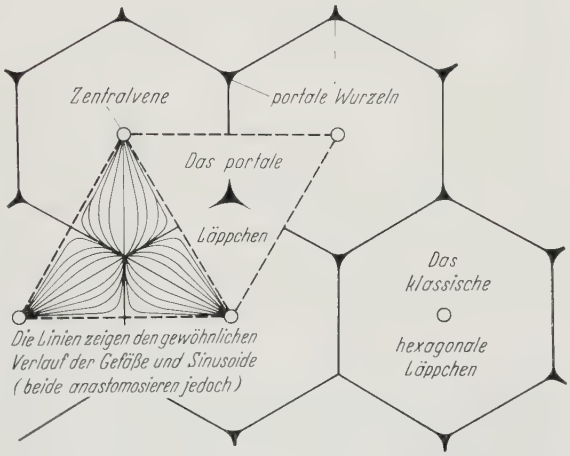


Abb. 18. Schema des portalen und des hexagonalen (klassischen) Läppchens nach Ham

und Negativ. Inzwischen haben zahlreiche Untersuchungen über die histochemische Verteilung anderer Enzyme den Nachweis erbracht, daß deren Muster mit dem der Atmungsfermente grundsätzlich übereinstimmt (Zusammenstellung bei Novikoff 1959), sofern überhaupt Konzentrationsunterschiede innerhalb des Parenchyms hervortreten. Die Realität der histochemischen Befunde ist durch mikrochemische Analysen an gezielt entnommenen Parenchymarealen weitgehend bestätigt worden (Shank, Morrison, Cheng, Karl u. Schwarz 1959). Auf Grund der histochemischen und mikrochemischen Befunde ist demnach erwiesen, daß die überwiegende Mehrzahl von Enzymen und anderen biochemischen Konstituenten inhomogen, aber nach einem bestimmten Muster über das Leberparenchym verteilt ist. Das Verteilungsmuster hat eindeutig Beziehungen zur Gliederung der terminalen Strombahn und variiert mit dem Läppchenbau der verschiedenen Tierspecies.

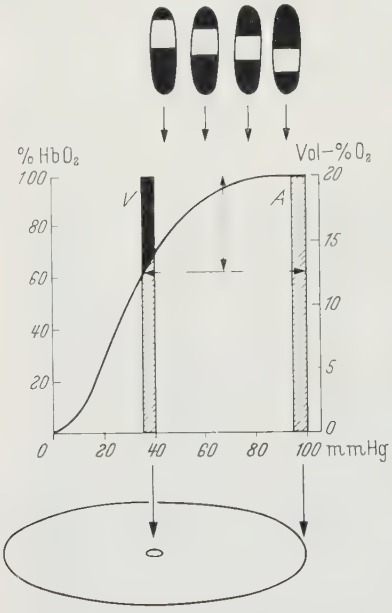


Abb. 19. Relative Enzymkonzentration in Mitochondrien verschiedener Läppchenzonen. Das Läppchen ist als Kroghscher Gewebszylinder dargestellt; das Diagramm (nach Opitz u. Lübbers 1957) veranschaulicht den Abfall der Sauerstoffspannung und der Sauerstoffsättigung zwischen arteriellem und venösem Schenkel der Sinusoide. Über dem Diagramm die relative Enzymkonzentration in den Mitochondrien der betreffenden Läppchenzone; die Konzentration der SDH (obere schwarze Komponente) sinkt mit der Sauerstoffspannung ab, die Konzentration der DPN-Diaphorase (weiße Komponente) steigt mit fallender Sauerstoffspannung geringfügig, die der TPN-Diaphorase (untere schwarze Komponente) dagegen stärker an

Aus diesem Sachverhalt ergeben sich wesentliche Folgerungen für das Verständnis der funktionellen Gliederung des Leberparenchyms und für die Entwicklung lokalisierter Parenchymschäden. Entgegen den bisherigen Vorstellungen ist das histogenetisch einheitliche Parenchym biochemisch inhomogen. Der Stoffbestand der einzelnen Parenchymzellen variiert planmäßig mit deren „Standort" innerhalb des Läppchenquerschnittes. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß auch solche Enzyme, die funktionell und strukturell besonders eng miteinander verknüpft sind, unterschiedlich über den Läppchenquerschnitt verteilt sind. Das gilt vor allem für die verschiedenen Atmungsfermente (SDH und Cytochromoxydase bzw. DPN- und TPN-Diaphorase). Da diese Fermente zum überwiegenden Teil in den Mitochondrien lokalisiert sind, so folgt daraus, daß der Enzymbestand der Mitochondrien in den verschiedenen Läppchenzonen ebenfalls planmäßig variiert; in Abb. 19 sind diese Beziehungen schematisch dargestellt. Falls dieser Befund bestätigt wird, muß die bisherige Ansicht der Biochemiker, daß die Fermentausstattung der Mitochondrien einheitlich sei, revidiert werden.

Für *Kliniker* und *Pathologen* liefert die topographische Histochemie des Leberparenchyms eine neue Basis zum Verständnis lokalisierter Funktionsstörungen und Parenchymschäden. Neben vasomotorischen Phänomenen, die den Ort einer Parenchymläsion bestimmen können (Ricker 1924; Loeffler u.

Nordmann 1925; Wakim u. Man 1942; Seneviratne 1949; Siegmund 1952; Hamperl 1950—1952; Kettler 1958; Schumacher 1952) tritt die unterschiedliche Vulnerabilität der einzelnen Parenchymareale als lokalisatorisches Moment hervor. Es ist Aufgabe späterer Untersuchungen, die Bedeutung der funktionellen Heterotopie des Leberparenchyms (Zeiger 1952) für die Entwicklung lokalisierter Parenchymschäden zu klären. Wesentliches Anliegen dieser Untersuchung ist der Hinweis, daß das Leberparenchym der Säuger funktionell inhomogen ist und daß der Stoffbestand verschiedener Parenchymareale in Abhängigkeit von der Strombahngliederung planmäßig variiert. Die topographische Histochemie der Leber deckt sich weitgehend mit den Vorstellungen von Mall über die funktionelle Gliederung des Organparenchyms und liefert eine Stütze für die Auffassung, daß das portale Läppchen als eigentliches Bau- und Funktionselement der Leber anzusehen sei.

Zusammenfassung

Histochemische Untersuchungen über die Verteilung der Bernsteinsäuredehydrogenase (SDH) im Leberparenchym einiger Nager haben gezeigt, daß die Fermentkonzentration während der Fetalperiode sehr gering ist und nach der Geburt innerhalb weniger Wochen auf Werte ansteigt, die denen erwachsener Tiere entsprechen.

Das Muster der Fermentverteilung stimmt bei allen untersuchten Arten (Kaninchen, Ratte, Meerschweinchen) grundsätzlich überein und variiert lediglich mit der Läppchengliederung der betreffenden Art. Die Fermentkonzentration ist stets in jenen Parenchymarealen am größten, die terminalen und präterminalen Pfortader- und Leberarterienästen anliegen; von dort sinkt sie in Richtung auf die Zentral- und Sublobularvenen relativ stark ab. Infolge des Kontrastes zwischen fermentreichen periportalen und fermentarmen perivenösen Parenchymbezirken tritt die artspezifische Läppchengliederung deutlich hervor.

Auf Grund der histochemischen Befunde ist jener Parenchymanteil als Bau- und Funktionselement des Organs anzusehen, der vom gleichen terminalen Pfortader- und Leberarterienast gespeist und durch die Zentralvenen der umliegenden Läppchen drainiert wird. Dieser Parenchymteil entspricht dem sog. *portalen Läppchen* nach Mall (1953) oder dem Acinus nach Rappaport (1959). Das Muster von Parenchymschäden stimmt mit dem Muster der Fermentverteilung grundsätzlich überein und wird offenbar von der Gliederung der terminalen Strombahn bestimmt.

Nach den vorliegenden histochemischen und mikrochemischen Befunden ist eindeutig erwiesen, daß der Stoffbestand und damit die Funktion der einzelnen Parenchymareale planmäßig mit deren „Standort" innerhalb der Läppchen variiert. Die funktionelle Heterotopie der Leber (Zeiger 1952) ist damit auch histo- und mikrochemisch belegt. Das lenkende Prinzip, das der histochemischen Stoffverteilung zugrunde liegt und die Folgerungen, die sich aus den neueren Befunden für das Verständnis der funktionellen Gliederung des Organparenchyms ergeben, werden an Hand des Schrifttums und der eigenen Befunde diskutiert.

Literatur

Boell, E. J.: Succinic dehydrogenase activity during the development of Amblystoma punctatum. Anat. Rec. Suppl. **96**, 91ff. (1946).

Bolck, F.: Die Organe. Die Organstruktur als Grundlage der Organleistung und Organerkrankung. Die Leber. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. III/2/1, S. 219 bis 270. Berlin: Springer 1960.

Cooper, C. D.: Succinic dehydrogenase activity in the pre-natal and post-natal rat heart. Anat. Rec. **123**, 103—119 (1955).

Duspiva, F.: Zur Biochemie der normalen Wirbeltierentwicklung. Naturwiss. **42**, 305—311 (1955).

— Entwicklung. Wachstum. Biochemie des Wachstums und der Differenzierung. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. VI/1, S. 307—374. Berlin: Springer 1955.

Elias, H.: A re-examination of the structure of the mammalian liver. I. Parenchymal architecture. Amer. J. Anat. **84**, 311—327 (1949).

— A re-examination of the structure of the mammalian liver. II. The hepatic lobule and its relation to the vascular and biliary systems. Amer. J. Anat. **85**, 379—426 (1949).

— Geometry of cell shape and adaptive evolution of liver. J. Morph. **91**, 365—387 (1952).

— In Liver injury. Transact. of the 11th Conf., Josiah Macy Found., New York, 1952.

Flexner, L. B.: Events associated with the development of nerv and hepatic cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. **60**, 986—1002 (1955).

— E. L. Belknap and J. B. Flexner: Biochemical and physiological differentiation during morphogenesis; cytochrom oxidase, succinic dehydrogenase and succinoxidase in development cerebral cortex and liver of fetal guinea pig. J. cell. comp. Phy. **42**, 151—161 (1953).

Flexner, J. B., and L. Hellermann: Zit. nach Flexner.

Goebel, A., u. H. Puchtler: Untersuchungen zur Methodik der Darstellung der Succinodehydrogenase im histologischen Schnitt. Virchows Arch. path. Anat. **326**, 312—331 (1955).

Ham, A. W.: The liver, p. 600—622. Histology. London: Lippincott 1953.

Hamperl, H.: Über eigentümliche, kreislaufbedingte Leberveränderungen (anämische Flecke, Fettinfarkt, granuläre Verfettung). Schweiz. Z. Path. **13**, 65—72 (1950).

— Eigentümliche Zirkulationsstörungen der Leber. Schweiz. med. Wschr. **80**, 43 (1950).

— Blutkreislauf und Lokalisation krankhafter Veränderungen in der Leber. Klin. Wschr. **30**, 154—155 (1952).

Kettler, L. H.: Die Leber. Der Kreislauf der Leber und seine Störungen. In Lehrbuch der speziellen Pathologie, herausgeg. von Kaufmann u. Staemmler, Bd. II/2, S. 1036—1071. Berlin: W. de Gruyter 1958.

Kiernan: Zit. nach Pfuhl.

Loeffler, L., M. u. Nordmann: Leberstudien I. Teil. Virchows Arch. path. Anat. **257**, 119 bis 181 (1925).

Mall, F. P.: Zit. nach Ham.

Moog F.: Adenylpyrophosphatase in brain, liver, heart and muscle of chicken embryos and hatchet chicks. J. exp. Zool. **105**, 209—220 (1947).

Novikoff, A. B.: Lobule of the rat (staining reactions). J. Histochem. Cytochem. **7**, 240—244 (1959).

Opitz, E., u. D. Lübbers: Allgemeine Physiologie der Zell- und Gewebsatmung. In Handbuch der allgemeinen Pathologie, Bd. IV/2/II, S. 395—481. Berlin: Springer 1957.

Pfuhl, W.: Verdauungsapparat. Die Leber. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. V/2/II, S. 235—476. Berlin: Springer 1932.

Potter, W., C. Schneider and G. J. Liebl: Enzyme changes during growth and differentiation in tissues of newborn rat. Cancer Res. **5**, 21—24 (1945).

Preissecker, E.: In Cohr, Jaffeé, Meessen, Pathologie der Laboratoriumstiere. Berlin: Springer 1958.

Rappaport A. H.: The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). Anat. Rec. **130**, 673—683 (1959).

Rappaport, A. H., and G. Y. Hiraki: The anatomical pattern of lesions in the liver. Acta anat. (Basel) **32**, 126—140 (1958).

Ricker, G.: Pathologie als Naturwissenschaft. Berlin: Springer 1924.
Rosa, C. G., and J. T. Velardo: Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase activity in tissue sections by modified technique. J. Histochem. Cytochem. **2**, 110—114 (1954).
Rutenburg, A. H., H. Wolman and A. H. Seligman: Comparative distribution of succinic dehydrogenase in 6 mammals and modification in histochemical technique. J. Histochem. Cytochem. **1**, 66—81 (1953).
Seligman, A. M., and A. M. Rutenburg: Histochemical demonstration of succinic dehydrogenase. Science **113**, 317—320 (1951).
Seneviratne, R. D.: Physiological and pathological responses in blood vessels of liver. Quart. J. exp. Physiol. **35**, 77—110 (1949).
Schumacher, H. H.: Vergleichende Untersuchungen zur Pathogenese akut-toxischer Leberschäden. Verh. dtsch. Ges. Path. **36**, 311—313 (1952).
— Histochemical distribution of respiratory enzymes in the liver lobule. Science **125**, 501—503 (1957).
— Zur Topographie von Reduktionsorten im Leberläppchen. Verh. dtsch. Ges. Path. **41**, 254—260 (1957).
— Histochemie der Zellatmung bei Hypoxydose. Verh. dtsch. Ges. Path. **42**, 395—399 (1959).
Shank, R. E., G. Morrison, C. H. Cheng, J. Karl and R. Schwarz: Cell heterogeneity within the hepatic lobule (quantitative histochemistry). J. Histochem. Cytochem. **7**, 237—239 (1959).
Siegmund, H.: Naturwissenschaftliches und spekulatives Denken in der modernen Krankheitslehre. Verh. dtsch. Ges. Path. **32**, 300ff. (1948).
— Allgemeine Pathologie der Leberparenchymveränderungen unter besonderer Berücksichtigung zirkulatorischer und nutritiver Faktoren. Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr. Sdb. 31—53 (1952).
Sippel, A.: The growth of succinoxydase activity in the hearts of rat and chick embryos. J. exp. Zool. **126**, 205—221 (1954).
Strughold, B.: Hypoxydose. Klin. Wschr. **1944**, 221—222.
Wakim, K.G., and F. C. Mann: Effect of experimental cirrhosis on intrahepatic circulation of blood in intact animal. Arch. Path. (Chicago) **33**, 198—303 (1942).
— — Intrahepatic circulation of blood. Anat. Rec. **82**, 233—253 (1942).
Zeiger, K.: Zur funktionellen Anatomie der Leber. Dtsch. Z. Verdau.- u. Stoffwechselkr. **15**, 22—31 (1952).

Prof. Dr. med. H. H. Schumacher
Bernhard-Nocht-Institut für Schiffs- und Tropenkrankheiten,
Hamburg 4, Bernhard-Nocht-Straße 74

Zeitschrift für Zellforschung 54, 468—498 (1961)

Aus dem Physiologischen Institut der Universität des Saarlandes Homburg (Saar)
(Direktor: Prof. Dr. R. Stämpfli)

STRUKTURVERÄNDERUNGEN DES RANVIERSCHEN SCHNÜRRINGS WÄHREND DES ELEKTROTONUS UND WÄHREND DER FUNKTIONELLEN ZERSTÖRUNG*

Von

H. Müller-Mohnssen

Mit 9 Textabbildungen in 83 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 25. Januar 1961)

Wegen methodischer Schwierigkeiten beim Versuch, neben der Mikrophotographie des einzelnen Schnürrings gleichzeitig die elektrische Reizung und Ableitung an der einzelnen markhaltigen Nervenfaser durchzuführen, beschränken sich unsere bisherigen Untersuchungen lediglich auf die morphologischen Wirkungen elektrophysiologisch aktiver Substanzen. Ein geringfügiger Umbau der von Stämpfli (1958) angegebenen Apparatur zur Ableitung am Luftspalt ermöglicht jetzt die elektrische und mikroskopische Registrierung im gleichen Experiment.

Mit einer solchen Anordnung wurden die morphologischen Begleiterscheinungen der „spontan" ablaufenden funktionellen Zerstörung untersucht. Zugrunde lag die Frage, ob der mit der funktionellen Zerstörung einhergehenden Verkleinerung und Verbreiterung des Aktionspotentials (AP) einheitliche Vorgänge an der Struktur des Schnürrings zuzuordnen sind. Vor allem sollte ermittelt werden, ob dem Erlöschen der Funktion eine spezifische Veränderung der lichtmikroskopischen Struktur zugrunde liegt.

Ferner wurden die morphologischen Veränderungen des Schnürrings näher untersucht, die mit elektrotonisch bedingten Funktionsänderungen einhergehen. Von Interesse erschien dabei, ob die Unterschiede zwischen der morphologischen Wirkung schwacher Ströme, die zu Funktionsänderungen — beim Anelektrotonus sogar zur Verbesserung der geschädigten Funktion führen — und starker Ströme, die einen Durchschlag der Membran mit Vernichtung der Funktion hervorrufen, qualitativer oder nur quantitativer Art sind.

Methode

Als Grundausrüstung unserer Versuchsanordnung diente die 3-Elektrodenanordnung zur Ableitung am Luftspalt (Stämpfli 1956, 1958). Sie besteht aus einem mit Ringer- oder Testlösungen durchströmten Röhrchen von 1 mm Durchmesser und zwei seitlich dazu angeordneten mit Ringer gefüllten Glaströgen. Mittelkanal und beide Tröge werden getrennt über KCl-Agarbrücken mit den drei unpolarisierbaren Reiz- bzw. Ableitelektroden verbunden. Zur Reizung diente ein GRASS-Reizgerät. Die AP und Ruhepotentialänderungen wurden über eine imperative Vorstufe (Toennies) mit positiver Rückkopplung (Mitführung zur Kompensation schädlicher Kapazitäten in der Umgebung der Faser) auf einem Kathodenstrahl-Oszillographen registriert.

* Die Untersuchungen wurden durchgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Nachdem der zu untersuchende Schnürring einer einzelnen motorischen Nervenfaser des Frosches im Mittelkanal und die beiden benachbarten Schnürringe in den Glaströgen gelagert sind, werden die Tröge auseinandergeschoben und somit die zwischen ihnen und dem Mittelkanal bestehende Flüssigkeitsverbindung getrennt. Der auf beiden Seiten des Mittelkanales entstandene Luftspalt wird von etwa 0,5 mm langen Abschnitten der Internodien zwischen dem untersuchten und seinen Nachbarschnürringen überbrückt. Über diese Internodien, deren Außenwiderstand durch Verminderung der Außenflüssigkeit zu einem kapillaren Film bis auf 100 Megohm ansteigt, kann man sich in den Stromkreis zwischen den Schnür-

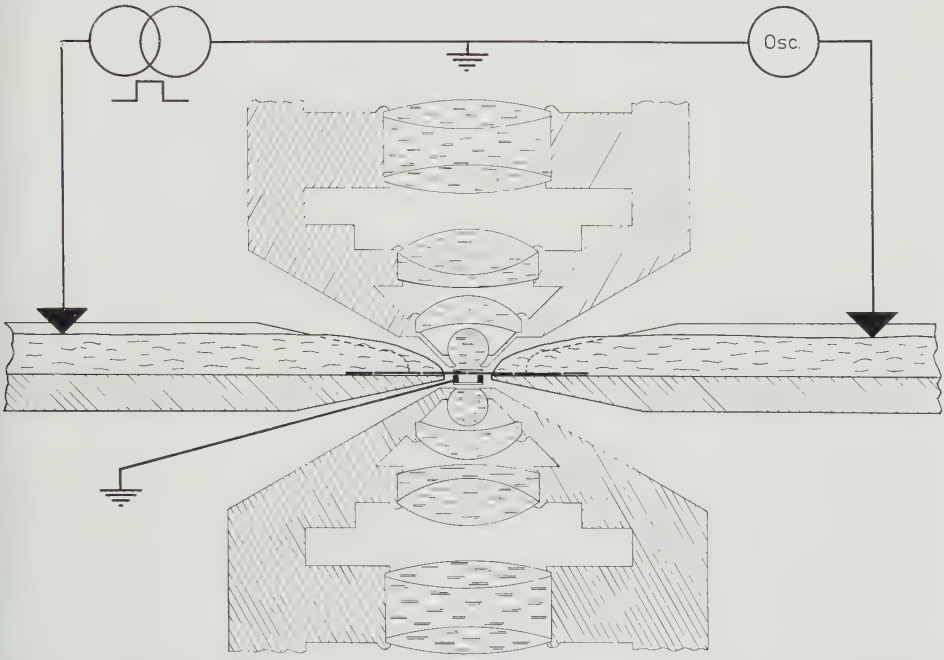


Abb. 1. Versuchsanordnung zur gleichzeitigen Registrierung elektrophysiologischer und morphologischer Befunde am einzelnen bespülten Schnürring. Schematischer Querschnitt durch die aufnahmebereite Versuchsanordnung; maßstäblich (nur der Durchmesser der Einzelfaser wesentlich vergrößert). Im Mittelpunkt des Bildes der Durchströmungskanal, Seitenwände: Silber, Deck- und Bodenplatten: Glas. Seitlich Ringertröge bis auf Luftspaltbreite herangeschoben. Untersuchter Schnürring im Kanal, Nachbarschnürringe auf den Trögen gelagert. Dazwischenliegende Internodalabschnitte überbrücken den Luftspalt. Zwischen linker und mittlerer Elektrode Reizstromkreis, rechts der Ableitkreis

ringen einschalten und Spannungen aus einem Reizgerät anlegen bzw. die am Schnürring entstehenden Potentialdifferenzen ableiten. Die angegebenen AP und Ruhepotentialänderungen sind stets unkorrigierte Werte, die nur 50—80% der wahren Potentialgrößen ausmachen, da der Kurzschlußfaktor unberücksichtigt bleibt.

Der gleichzeitigen Registrierung morphologischer und elektrophysiologischer Befunde stellen sich folgende methodische Schwierigkeiten in den Weg:

1. Die Dimension der für die elektrische Ableitung erforderlichen Lagerungsvorrichtung ist so groß wie das Präparat selbst, also wesentlich kleiner als die gebräuchlichen Immersionsobjektive und Kondensoren. Daher ist eine Störung der elektrischen Ableitung durch die mikroskopische Untersuchung schwer vermeidbar.

2. Um mikroskopische Aufnahmegeschwindigkeiten annähernd in der Größenordnung der elektrischen Registriergeschwindigkeit zu erreichen, sind kinematographische Aufnahmen erforderlich.

3. Die Anwendung von Immersionsobjektiven mit der erforderlichen hohen Apertur wird durch die Einbettung der überlebenden Schnürringe in strömende Flüssigkeit erschwert, da keine Mischung zwischen Öl und Wasser und keine leitende Verbindung des

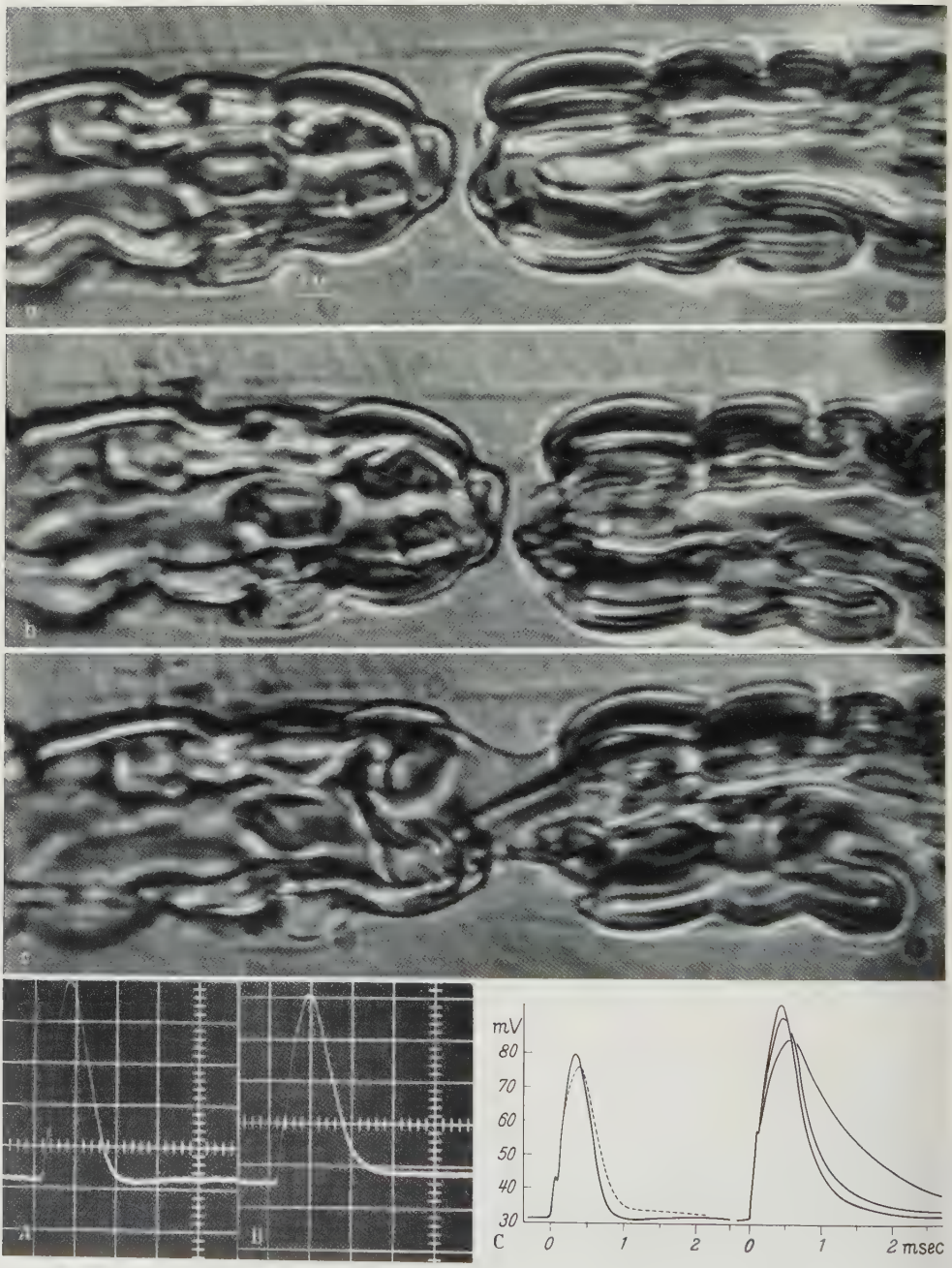
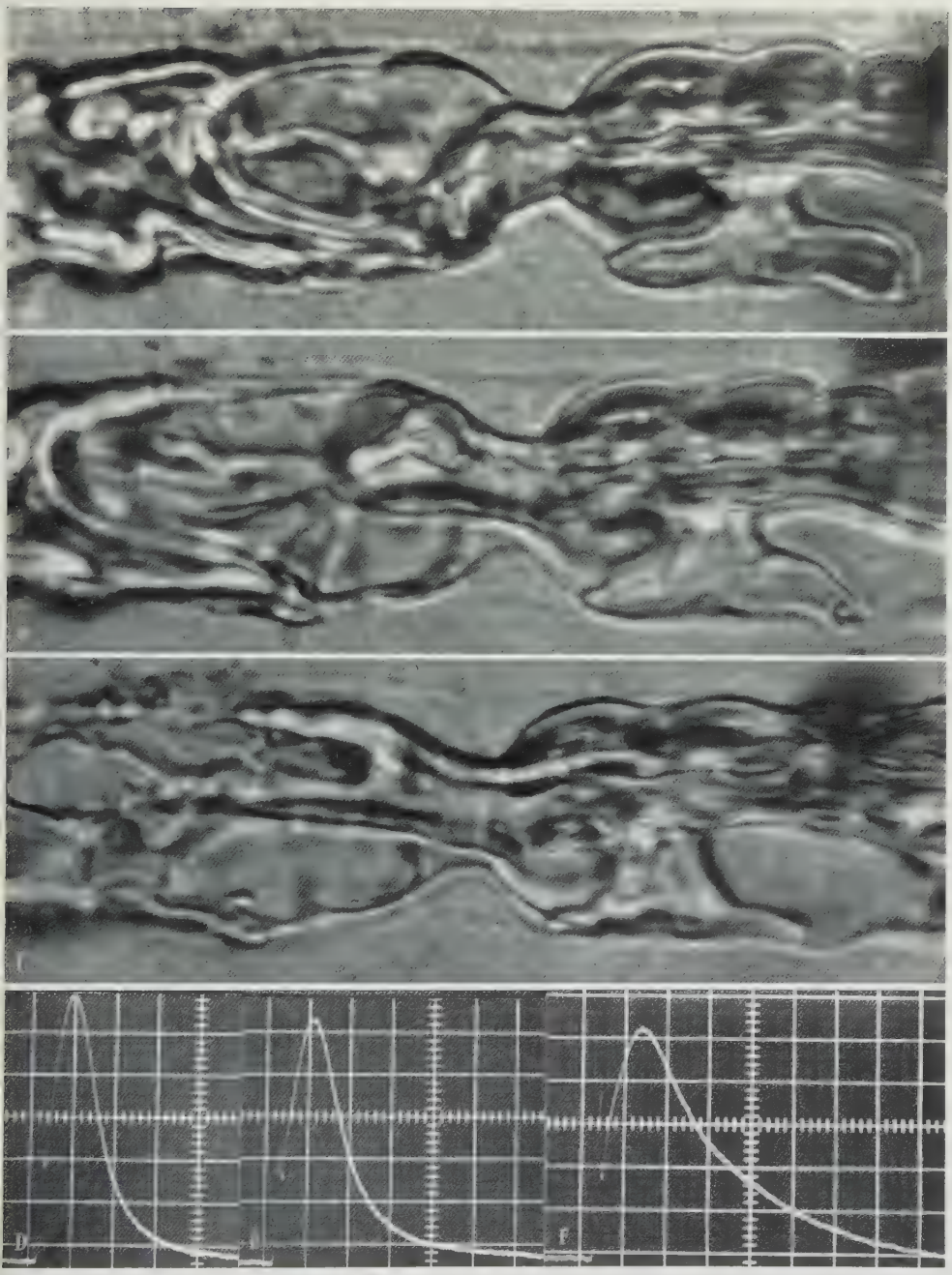


Abb. 2a—f. Zerstörung des Schnürrings durch Überfließen von Myelin. a Schmale, frisch präparierte Faser. Scharf gezeichneter linker Markkegel. Der rechte Markkegel wird von der nodalen Begrenzung des rechten Segmentendes verdeckt. Höhe des AP: 92 mV (*A*). b Nach 5 min: Rechter Markkegel schiebt sich vor und wird jetzt vollständig sichtbar. Nodale Markkegelgrenze rechts undeutlich. c 15 min: Rechter Markkegel verlängert sich und fließt über die Knotenbrücke hinweg in das linke Segmentende. Dazugehöriges AP (*B*) verkleinert: 80 mV; verzögerte Repolarisation. *C* links: beide AP zum Vergleich übereinanderkopiert. d 20 min, e 30 min: Polarisation von $\Delta V_m = 40$ mV. Das Myelin des rechten Markkegels fließt nicht mehr weiter. Zurückweichen des Myelins aus dem linken



Segmentende (Unterbrechung des Überfließens, jedoch keine Restitution des Schnürrings). Zwischen den deutlich voneinander abgegrenzten Myelinanteilen links/rechts im linken Segmentende entsteht ein blasenförmiger, myelinfreier „Hohlraum". Durch Myelinverlust bildet sich auch im rechten Segmentende ein solcher Hohlraum. Repolarisationsphase der AP (*D* und *E*) verlängert sich zunehmend. Trotz gleichbleibender Höhe der Polarisation nimmt die Amplitude ab. f 45 min: Nach Unterbrechung der Polarisation fließt das aus dem rechten Internodium stammende Myelin weiter in das linke Segmentende ein. Starke Verlängerung des AP (*F*, *C* rechts)

strömenden Mediums über das Objektiv mit der Umgebung entstehen darf. Die Olimmersion wird möglich, wenn das zur Aufnahme des untersuchten Schnürrings dienende, offene Polyäthylenröhrchen in der Anordnung von Stampfli durch ein Plexiglas oder Silberröhrchen ersetzt wird, das durch Deck- und Bodenplatten aus Glas verschlossen werden kann.

Herstellung der Glasküvette. Die Wand eines Plexiglas- oder Silberröhrchens von 1,0 mm Durchmesser wird senkrecht zur Längsachse mit einer exzentrischen Bohrung von 0,05 mm versehen und in der Ebene dieser Bohrung auf zwei, einander gegenüberliegenden Seiten in einer Länge von 15 mm rechteckförmig abgefräst, bis zwei Stege von 0,5 mm Stärke bestehen bleiben. Die Stege bilden den Rahmen für rechteckige Glasfenster entsprechender Größe, mit denen das Röhrchen auf beiden Seiten abgedeckt und verkittet wird. Als einzige Öffnungen bleiben die zur Hälfte abgefrästen, einander gegenüberliegenden Bohrungen von 0,05 mm. Das Röhrchen wird zwischen den Zweiwegehahn, der die Testflüssigkeit zuleitet und dem strömungsabwärts gelegenen Absperrhahn derart montiert, daß die Glasplatte, unter der sich die Öffnungen befinden, oben liegt, also als Deckplatte dient.

Die einzelne Nervenfaser wird vom distalen Nervenabschnitt getrennt an eine Nylonfaser geknüpft und mit ihrer Hilfe in den geschlossenen Durchströmungskanal eingezogen.

Optische Anordnung (Abb. 1). Um die Apertur des Betrachtungsobjektivs voll ausnutzen zu können, dienten zur Betrachtung wie zur Beleuchtung Objektive der gleichen Bauart (Zeiss-Apochromat 100/130). Zur Vermeidung des Kontaktes mit der Faser im Luftspalt und der Flüssigkeit auf den Trögen mußte die Frontplatte des Betrachtungsobjektivs zu einem spitzeren Konus abgeschliffen werden. Das Futter der Linsenfassung wurde dabei soweit entfernt, daß der Gesamtdurchmesser von Frontlinse mit Fassung und erhaltenem Futter der Deckglasbreite, also höchstens 1,4 mm entspricht. Das gleiche, mit Aperturblende versehene Objektiv wurde als Kondensor unterhalb der Bodenplatte des Durchströmungskanals in einer Zentrierfassung montiert, daß es beliebig, je nach der Lage des Schnürrings, justiert werden konnte. Die Beleuchtung erfolgte mit einer Quecksilber- oder Xenonlampe nach dem Köhlerschen Beleuchtungsprinzip.

Nach Auftragen des Immersionsöls auf die Deckplatte wird das an einem einfachen Stativ befestigte Betrachtungsobjektiv auf den Schnürring eingestellt. Der Fuß des Stativs gleitet auf einer 20 kg schweren, zur Dämpfung von Erschütterungen auf Tennisbällen gelagerten Eisenplatte, die als Sockel für die gesamte Apparatur dient. Über eine Haltevorrichtung, die das Stativ auf der Eisenplatte befestigt, kann die Zentrierung des Objektivs vorgenommen werden.

Kamera: Leica mit Zeiss-Mikroaufsatz bzw. für die Mikrokinematographie eine einäugige Pathé-Spiegelreflex-Kamera. Die Xenonlampe erwies sich als ausreichend für eine Bildfolge von 16—24 sec.

Ergebnisse

Spontan ablaufende Zerstörungsvorgänge

Die Vorgänge, die zur spontanen Zerstörung des überlebenden Schnürrings führen, können in zwei typischen Formen ablaufen. Die Häufigkeit, mit der der eine oder andere Zerstörungsvorgang eintritt, hängt von der angewandten Untersuchungsmethode und den jeweiligen Versuchsbedingungen ab. Da der Brechungsindex der Myelinscheide größer ist als der aller übrigen Strukturelemente der Nervenfaser, treten im lichtmikroskopischen Bild vor allem die Veränderungen der Markscheide in Erscheinung.

Die am bespülten Schnürring häufig zu beobachtende Form der Zerstörung beginnt mit dem *Überfließen des Myelins* aus einem der Segmentenden über die Knotenbrücke hinweg in das benachbarte Internodium (Abb. 2). Am häufigsten führt die Bespülung mit hypotonischen, alkalischen und K^+-reichen Lösungen, oder ein Katelektrotonus zum Überfließen.

In der Regel kündigt sich die Mobilisierung des Myelins durch eine verschwommene Abbildung des überwandernden Markkegels an. Der Markkegel

verlängert sich zu einem zungenförmigen Ausläufer unterschiedlicher Breite und schiebt sich über das nodale Axon. Unter zunehmender Verlängerung dringt der Myelinausläufer nach wenigen Sekunden bis mehreren Minuten in das Nachbarinternodium ein. Gleichzeitig mit dem Vorwandern des einen Markkegels zieht sich der gegenüber liegende zurück. Die Grenze zwischen den Myelinanteilen, die zu dem „überfließenden" und dem „zurückweichenden" Internodium gehören,

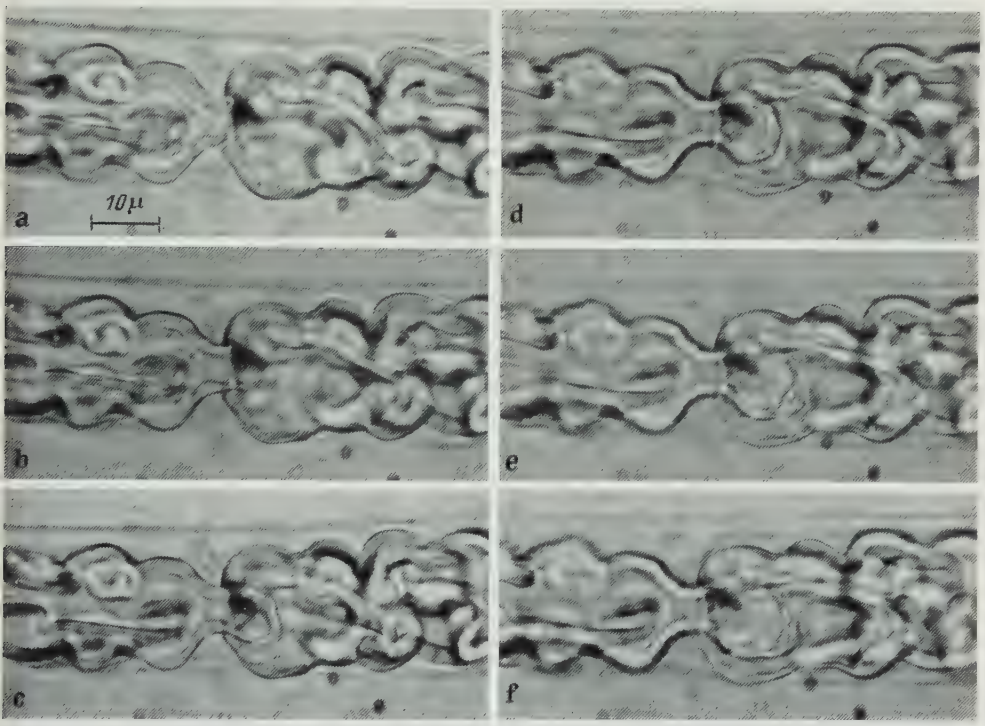


Abb. 3a—f. Zerstörung durch Überfließen des Myelins. Janusgrün-Vitalfärbung. a Die in der Abbildung dunkel angefärbte, dem Schwannschen Plasmakompartiment entsprechende Struktur wandert bis zum nodalen Endabschnitt des rechten Segmentendes vor dem überfließenden linken Markkegel her. b Nach 30, c 60, d 90, e 120, f 150 sec, während der linke Markkegel weiter in das rechte Segmentende einwandert, bleibt die angefärbte Struktur im Bereich der nodalen Begrenzung liegen

bleibt deutlich sichtbar, selbst wenn sie weit in das Segmentende des letzteren verschoben wurde.

Während sich die vorwandernde Grenze konvex, die zurückweichende konkav wölbt, verlieren sie ihre Parallelstellung und ihr Abstand vergrößert sich. Das Myelin des „Wirt"-Internodiums zieht sich weiter zurück als das überfließende vordringt. So entstehen blasige, myelinfreie Hohlräume, zunächst in einem der Segmentenden, durch Myelinverlust später auch im Segmentende des überfließenden Internodiums. Während das überfließende Myelin den nodalen Axonabschnitt zunächst nur zu einem Teil seines Umfanges überlagert, wird er mit fortschreitender Myelinverschiebung schließlich vollständig bedeckt. Bis zuletzt bleibt die nodale Einschnürung an ihrem ursprünglichen Ort bestehen.

Schon im frühesten Beginn des Überfließens tritt gemeinsam mit dem Anstieg der Reizschwelle eine Verlängerung der Repolarisationsphase ein, dann erst folgt

eine Amplitudenabnahme des Aktionspotentials. Die Myelinüberlagerung der nodalen Axonoberfläche scheint in der Behinderung der Diffusionsvorgänge an der erregbaren Membran eine Erklärung für die vergrößerte Zeitkonstante des AP

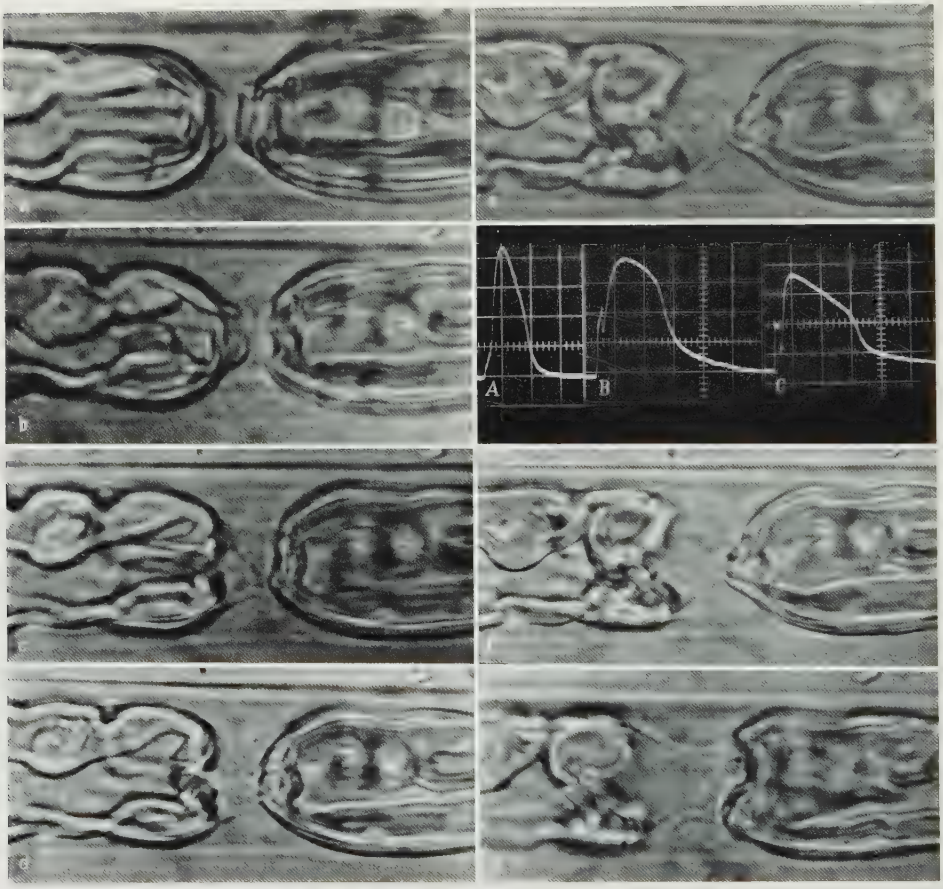


Abb. 4a—g. Zerstörung durch Zurückweichen des Myelins. a Frisch präparierter Schnürring mit symmetrisch gestalteten Markkegeln und engem Spaltraum. Höhe des dazugehörigen AP (s. *A*): 80 mV. b 5 min: Zurückweichen des Myelins aus dem rechten Myelinkegel. c 10 min: Auch der linke Myelinkegel hat sich zurückgezogen, so daß eine symmetrische Spaltraumverbreiterung resultiert. Es ging ein Anelektrotonus von $\Delta V_m = 40$ mV voraus. Die linksseitige Markkegelgrenze an einer den Spaltraum schräg durchziehenden Linie noch erkennbar. AP (*B*) verbreitert, nur während der Polarisation auslösbar. d 20 min: Im Anschluß an eine 60 sec dauernde Depolarisation ist die Markkegelgrenze verschwunden. e Nach 35 min: Rechter Markkegel wandert als spitzer Konus in den Spaltraum ein, myelinfreie Zone weiter vergrößert. Zunehmende Verbreiterung des AP (*C*) und Verringerung der Amplitude. f 36,5 min: Nach kurzzeitiger Depolarisation von $\Delta V_m = 25$ mV ist die Funktion erloschen. Dabei keine deutlichen Veränderungen des mikroskopischen Bildes. g 45 min: Die myelinfreie Zone erscheint optisch leer

zu geben. Mit fortschreitender Abdeckung des nodalen Axonabschnittes steigt die Schwelle, verbreitert und verkleinert sich das AP kontinuierlich. Schließlich erlischt die Erregbarkeit ohne eine bemerkenswerte Veränderung im lichtmikroskopischen Bild.

Der zweite typische Zerstörungsvorgang, der auch während der Behandlung mit Ca^{++}-reichen Ringerlösungen beobachtet wurde, verläuft wesentlich langsamer.

Er besteht im Gegensatz zu dem ersten im *Zurückweichen des Myelins* aus Markkegeln und Segmentenden (Abb. 4). Im Beginn verkürzen sich die Markkegel, am häufigsten nacheinander, so daß ein unsymmetrisches Bild entsteht, seltener gleichzeitig. Während die Markkegel zusammenschrumpfen, verschieben sich ihre nodalen Grenzen in Richtung auf die zugehörigen Internodien. Der Spaltraum erweitert sich dabei zunehmend, bis er nach vollständigem Verschwinden der Markkegel schließlich durch die Segmentenden begrenzt wird. In diesem Stadium beträgt die Spaltraumbreite bereits mehr als das Fünffache des ursprünglichen Wertes. Damit ist der Prozeß nicht abgeschlossen. Gewöhnlich zieht sich das Myelin auch aus den Segmentenden zurück. Oft erreicht die Länge der myelinfreien Zone schließlich das Zwanzigfache der normalen Spaltraumbreite.

Da das Myelin nicht in einer geradlinigen Front abwandert, verlieren die Begrenzungen der myelinfreien Zone jetzt ihre Parallelstellung, wenn sie nicht schon vorher durch exzentrisches Abwandern des Myelins aus den Markkegeln einen unregelmäßigen Verlauf angenommen hatten.

Im myelinfreien Abschnitt bleibt zunächst eine Doppelkontur parallel gestellter Linien erhalten, die nicht durch Beckesche Linien vom Phasenübergang Myelin-Plasma bzw. Schwannplasma vorgetäuscht sein kann, da sie sich mit Heben und Senken des Tubus ohne räumliche Orientierung zum Myelin verschiebt und sich auch nachweisen läßt, wenn das Myelin abgewandert ist, oder anders geformte Begrenzungen zeigt. Wenn am Ende des Zerstörungsvorganges auch diese Linien verschwunden sind, bleibt eine granuläre Zeichnung zurück oder eine vollständige optische Homogenität.

Überraschend und nicht ohne weiteres verständlich erscheint, daß dieser zweite zu einer Verbreiterung des Spaltraums, also zur Vergrößerung der Diffusionsfläche führende Zerstörungsvorgang von den gleichen Veränderungen des AP begleitet wird, wie der zuerst beschriebene. Ebenso wie dort, begleitet keine signifikante Veränderung des mikroskopischen Bildes den Übergang vom kleinen, langgedehnten AP zum vollständigen Erlöschen der Aktivität. Auch hier bleibt die phasische Aktivität und die elektrische Polarisierbarkeit noch nach weitgehender morphologischer Zerstörung des Schnürrings bestehen. So läßt es sich einem Schnürring nicht mit Sicherheit ansehen, ob er noch erregbar ist oder nicht. Dagegen ändert sich die Form des AP schon im frühesten Beginn der Zerstörung deutlich. Die morphologische Integrität ist also nicht Voraussetzung für die Aktivität des Schnürrings überhaupt, sondern nur für dessen Fähigkeit, ein vollständig normal verlaufendes AP zu erzeugen.

Veränderungen des Schnürrings beim Fließen starker Ströme

Der Einfluß starker Ströme auf den Schnürring bewirkt einen irreversiblen Zusammenbruch des Membranpotentials und der phasischen Aktivität. Diese von Stämpfli (1956, 1957) als Durchschlag gekennzeichnete funktionelle Zerstörung wird von einer morphologischen Zerstörung der nodalen Strukturen begleitet (Müller-Mohnssen 1958). Dieser Vorgang wurde mit verbesserter Methode eingehender untersucht. Übersichtlichere elektrische Verhältnisse gestatteten die Anwendung annähernd reproduzierbarer Spannungen. Durch die Kinematographie ließen sich die dem mikroskopierenden Beobachter als schlagartig erscheinenden morphologischen Veränderungen in ihre Einzelphasen auflösen.

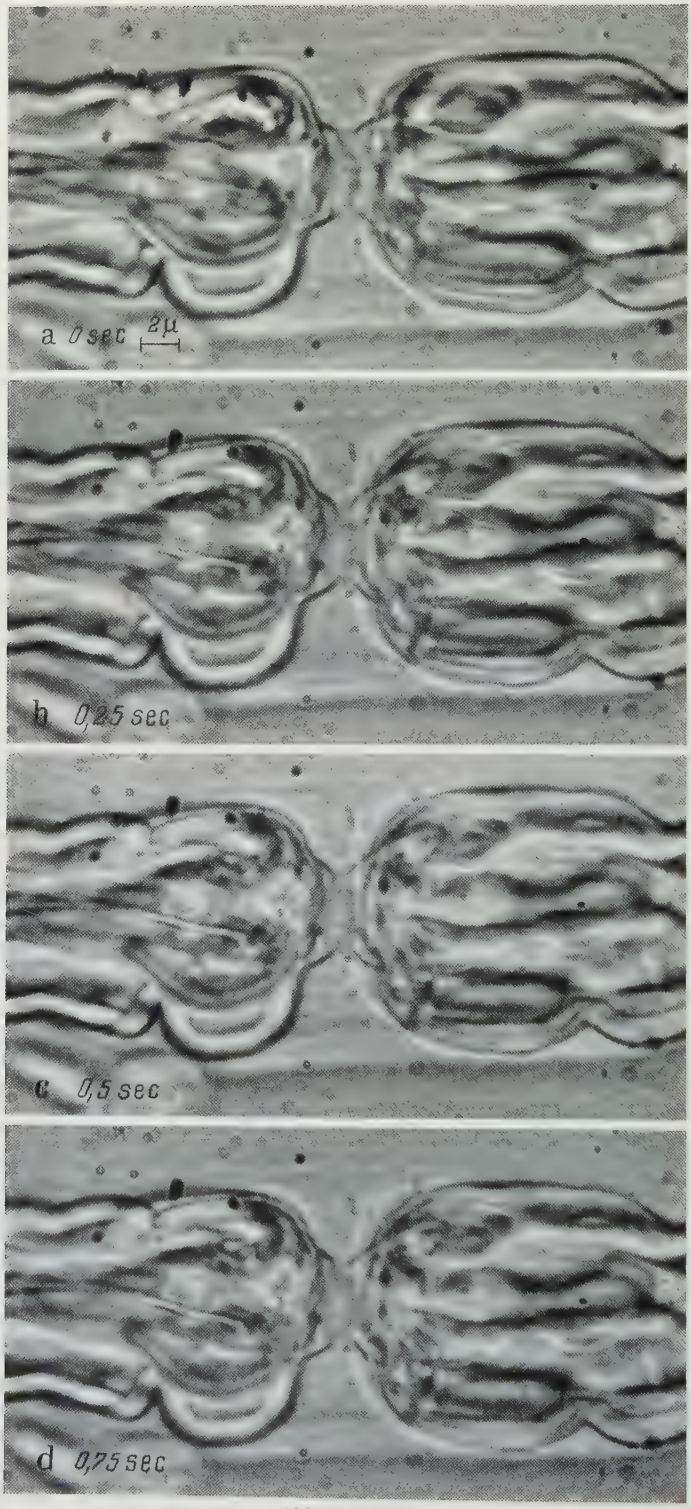


Abb. 5 a—d

Abb. 5a—m. Kinematographische Aufnahme eines Durchschlages durch symmetrischen Anelektrotonus von 6 V (beide Internodien stehen unter Spannung). a Intakter Schnürring mit engem Spaltraum und parallelem Faltenrelief. b 0,25, c 0,5, d 0,75 und e 1,0 sec nach Eintritt der ersten morphologischen Veränderungen in Zusammenhang mit dem Durchschlag ≈ Beginn des Durchschlags. Undeutliche Zeichnung der nodalen Markkegel. Unregelmäßiges Oberflächenrelief in den nodalen Grenzabschnitten der Segmentenden. f 1,75 sec, g 2,25 sec nodale Markkegelgrenzen wieder deutlich erkennbar. An der schlierenförmigen Streifung des Myelins und der geschlossenen Verschiebung kompakter Strukturelemente (streifenförmige, orthograd getroffene Myelinfalte. s. Pfeil) wird die Abwanderung des Myelins in Richtung auf die Nachbarschnürringe (Kathode) deutlich. Körnige Zeichnung des Myelins und Zerstörung des Faltenreliefs an den nodalen Grenzen beginnend, in die Segmentenden fortschreitend. h 3,25, i 4,0, k 6,0, l 8,0 und m 10,0 sec. Verschwinden der Markkegel, ständige Verbreiterung der myelinfreien nodalen Zone. Beschleunigte Abwanderung des Myelins, besonders deutlich im mittleren Anteil des linken und in den Randgebieten des rechten Segmentendes. Vollständige Zerstörung des normalen Faltenreliefs und körnige Zeichnung des gesamten im Bild erkennbaren Faserabschnitts. Xenonlampe, 16 mm Schmalfilm, Pathé-Spiegelreflex, etwa 16 Bilder pro Sekunde

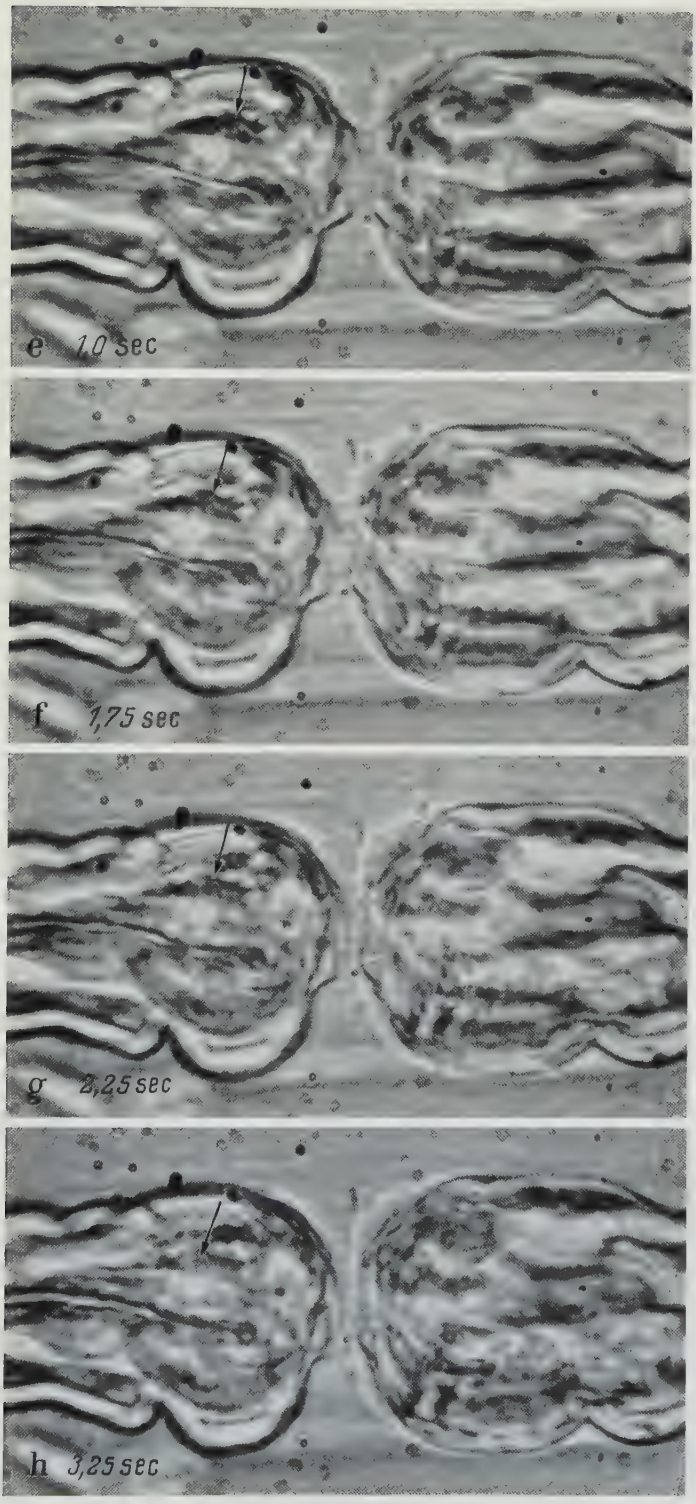


Abb. 5 e—h

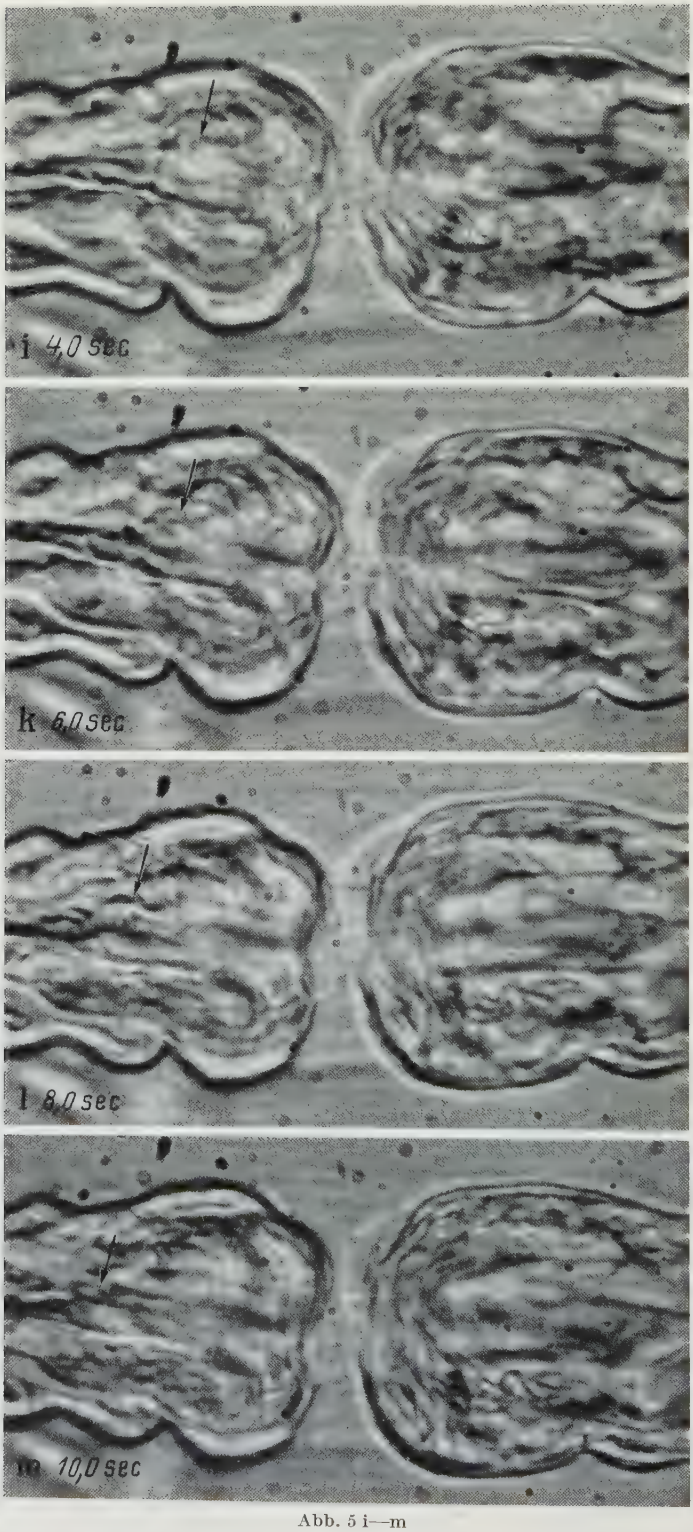


Abb. 5 i—m

Grundversuch. Um ein symmetrisches und übersichtliches Bild zu bekommen, wurden zunächst beide Ringertröge an das Reizgerät angeschlossen, so daß die Stromzuführung gleichzeitig über beide Nachbarschnürringe erfolgte. Ist die Mittelelektrode positiv gegenüber den Seitenelektroden, so herrscht am mittleren Schnürring ein Anelektrotonus, sind umgekehrt die Seitenelektroden positiv gegenüber der Mittelelektrode, ein Katelektrotonus. Da an beiden, dem untersuchten Schnürring benachbarten Internodien die gleiche Spannung liegt, sprechen wir von einem symmetrischen Elektrotonus bzw. Durchschlag. Der Durchschlag wurde mit Rechteckspannungsstößen von 1—30 Volt und 1 sec Dauer hervorgerufen.

Gleichgültig ob Anelektrotonus oder Katelektrotonus angewandt wird: in beiden Fällen entsteht eine ruckartige Verkürzung der Faser, die während der Dauer des Stromflusses bestehenbleibt. Sie ist besonders heftig während des kathodischen Durchschlags. Schnell aufeinanderfolgende Stromstöße werden von Einzelverkürzungen beantwortet. Oberhalb einer Frequenz von 10 Impulsen je Sekunde tritt eine Dauerverkürzung ein. Die Fähigkeit zur Verkürzung ermüdet allmählich; durch Umpolen läßt sie sich vorübergehend zurückrufen. An den Internodien hinterlassen auch wiederholte kräftige Spannungsstöße nur unbedeutende bleibende Veränderungen. Am Schnürring und den Segmentenden dagegen bewirken ruckartig einsetzende Verzerrungen der Form und Verschiebungen des Baumaterials gleichzeitig mit dem Erlöschen der Funktion bereits nach dem ersten Durchschlag eine irreversible Zerstörung der nodalen Struktur.

Die zu Beginn bis zur verschieden schnell eintretenden „Ermüdung" beliebig reproduzierbaren Vorgänge am Schnürring bestehen:

1. in einer augenblicklich mit der Schließung des Stromes auftretenden Veränderung der Abstände zwischen den nodalen Grenzen der Segmentenden. Die dadurch bedingte Veränderung der Spaltraumbreite geht erst im Zeitpunkt der Stromunterbrechung wieder zurück. *Anelektrotonus* bewirkt eine Verbreiterung des Spaltraums durch Auseinanderrücken (Abb. 5), *Katelektrotonus* umgekehrt eine Verschmälerung durch Zusammenrücken der Segmentenden (Abb. 6).

2. Im Augenblick der Stromschließung setzt eine Wanderung des Myelins ein, die am Schnürring ihren Ausgang nimmt. Während eines Anelektrotonus fließt das Myelin in zusammenhängenden Schlieren zentrifugal nach beiden Seiten auseinander in Richtung auf die Nachbarschnürringe, an denen die Kathode liegt (Abb. 5). An vollständig intakten Schnürringen beginnt die Myelinströmung erst nach der initialen Erweiterung des Spaltraums. Sie setzt zuerst langsam ein und wird mit anhaltendem Stromfluß zunehmend beschleunigt, um schließlich 5—10 μ/sec zu erreichen. An geschädigten Schnürringen werden von Anfang an größere Wanderungsgeschwindigkeiten beobachtet. Die Geschwindigkeit dieser Myelinströmung ist ab 1 Volt angelegter Spannung für das Auge als Bewegung erkennbar und wächst mit zunehmender Spannung. Der symmetrische Durchschlag hinterläßt eine schollig-körnige Zeichnung des Protoplasmas beider Segmentenden. Der zeitliche Ablauf der morphologischen Zerstörung, der in der Größenordnung von wenigen Sekunden liegt, ist der Abbildung zu entnehmen. Nach Unterbrechung des Stromflusses bleiben die Myelinmassen meistens an dem Ort liegen, den sie zu diesem Zeitpunkt erreicht hatten. Diese Abwanderung des Myelins läßt sich also nicht wie die Erweiterung des Spaltraums durch

Abschalten des Stromes rückgängig machen. Die Rückwanderung erfolgt erst unter dem Einfluß eines nachfolgenden Katelektrotonus.

Wird ein intakter Schnürring kathodisch polarisiert, so bleibt die Wanderung des Myelins aus (Abb. 6). Zusammen mit einer Verkleinerung der Spaltraumbreite setzt dagegen ein starker scholligkörniger Zerfall der nodalen Markscheidengrenzen beider Segmentenden ein. Diese schollige Denaturierung erreicht ein wesentlich größeres Ausmaß als während des anodischen Durchschlags. Im übrigen sind die bleibenden Veränderungen wesentlich geringfügiger als nach dem anodischen Durchschlag, da die Abwanderung des Myelins fehlt. Nur an Schnürringen, die durch Auseinanderweichen des Myelins geschädigt sind, wird durch kathodische Polarisation eine Myelinwanderung hervorgerufen. Die Myelinanteile beider anliegenden Internodien bewegen sich zentripetal und prallen im Bereich des Spaltraums aufeinander.

Da die lichtoptische Nachweisbarkeit des Myelins wegen seines hohen Brechungsindex und wegen seiner Doppelbrechung leichter ist als die aller übrigen Bestandteile der Nervenfaser, erscheint im lichtmikroskopischen Bild vorwiegend die Bewegung des Myelins. An Schnürringen, deren Myelin in die Segmentenden abgewandert ist, läßt sich während des elektrischen Stromflusses außerdem die Bewegung einer Flüssigkeit mit geringem Brechungsindex und fehlender Doppelbrechung – im folgenden als Zellwasser bezeichnet — direkt beobachten. Die Geschwindigkeiten dieser im Bereich des wasserrreichen Axons auftretenden Zellwasserströmung übertrifft die der Myelinwanderung wesentlich. In der Regel fließt diese Strömung in Richtung auf den kathodisch polarisierten Schnürring. Umpolung kehrt auch die Strömungsrichtung am betrachteten Schnürring um.

Im Bereich des Luftspaltes führt dieser während der Dauer des Stromflusses anhaltende Wassertransport in wenigen Sekunden zu einer vollständigen Austrocknung und zur Verminderung des Faserdurchmessers. Auch größere, dem Faserabschnitt im Luftspalt anhaftende Flüssigkeitstropfen werden „aufgesaugt". Wenn die Faser jedesmal durch Anfeuchten wieder in Quellung gebracht wird, läßt sich dieser Vorgang einige Male wiederholen.

Entsprechende Vorgänge — jedoch unsymmetrisch — laufen ab, wenn die Spannung zwischen dem untersuchten und nur einem der Nachbarschnürringe angelegt und der dritte dagegen geerdet wird. Liegt am untersuchten Schnürring ein unsymmetrischer Anelektrotonus, so zieht sich das Myelin auf dieser Seite in Richtung auf den kathodisch polarisierten Nachbarschnürring zurück. Dabei erfährt nur das unter elektrischer Spannung stehende Internodium eine Verkürzung, so daß der Schnürring aus der Mitte auf eine Seite des Bildfeldes gezerrt wird. Die jeweils nach dem Durchschlag zu beobachtende schollige Denaturierung des dem Schnürring unmittelbar benachbarten internodalen Plasmas tritt jetzt nur im Segmentende der Reizseite auf.

Die elektrisch bedingte Myelinwanderung findet auch statt, wenn das Überfließen des Myelins über die Knotenbrücke in das gegenüberliegende Segmentende bereits vor dem Durchschlag zur morphologischen Zerstörung des Schnürrings geführt hat. Unter dem Einfluß eines Anelektrotonus am Schnürring zieht sich das überfließende Myelin wieder in das Ausgangsinternodium zurück, wenn einseitig an ihm die Spannung liegt. Die gleiche Rückwanderung tritt ein, wenn der Schnürring kathodisch polarisiert ist, jedoch nur dasjenige Internodium unter Spannung steht, in das die Myelinmassen eingedrungen sind (Abb. 7).

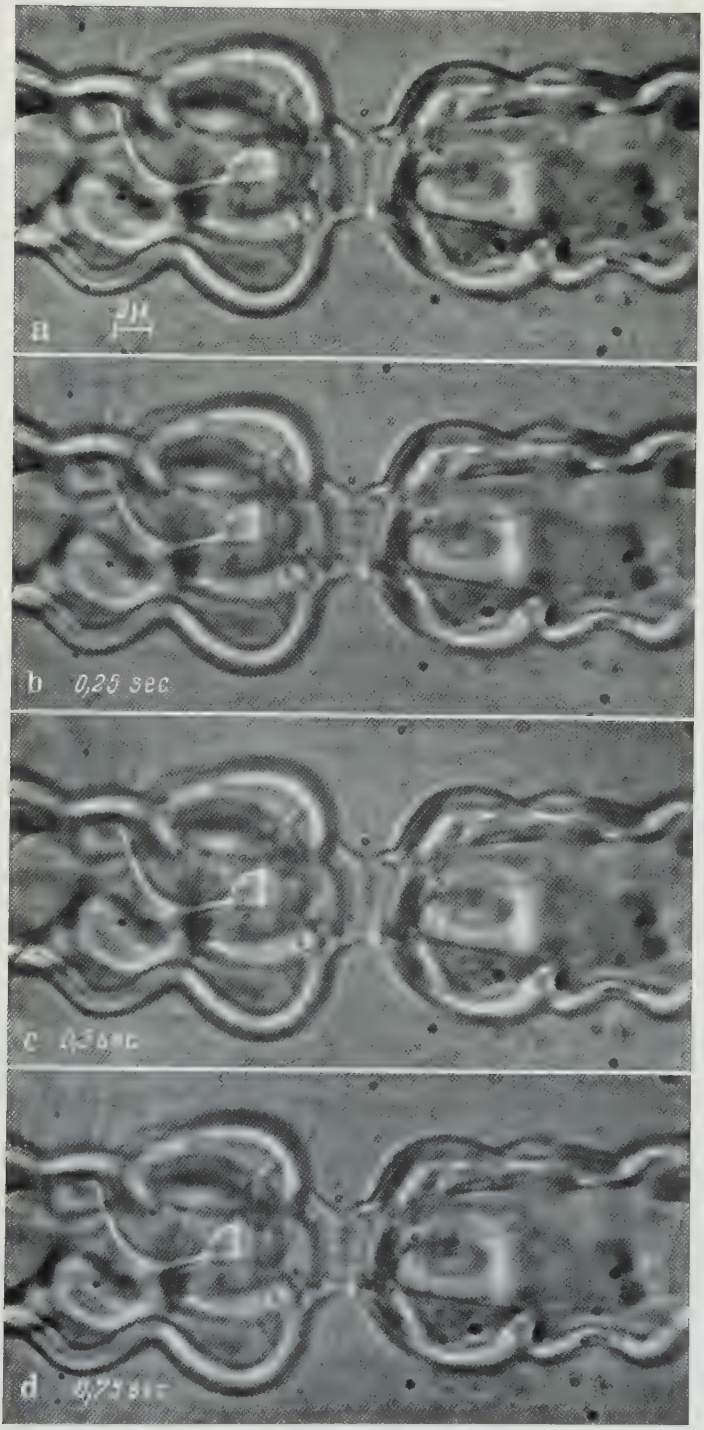


Abb. 6a—m. Kinematographische Aufnahme eines Durchschlags durch symmetrischen Katelektrotonus von 6 V. a Intakter Schnürring, strichförmig enger Spaltraum. b 0,25, c 0,5 und d 0,75 sec nach Eintritt der ersten morphologischen Veränderungen in Zusammenhang mit dem Durchschlag ≈ Beginn des Durchschlags. Unschärfe der nodalen Markkegelgrenzen

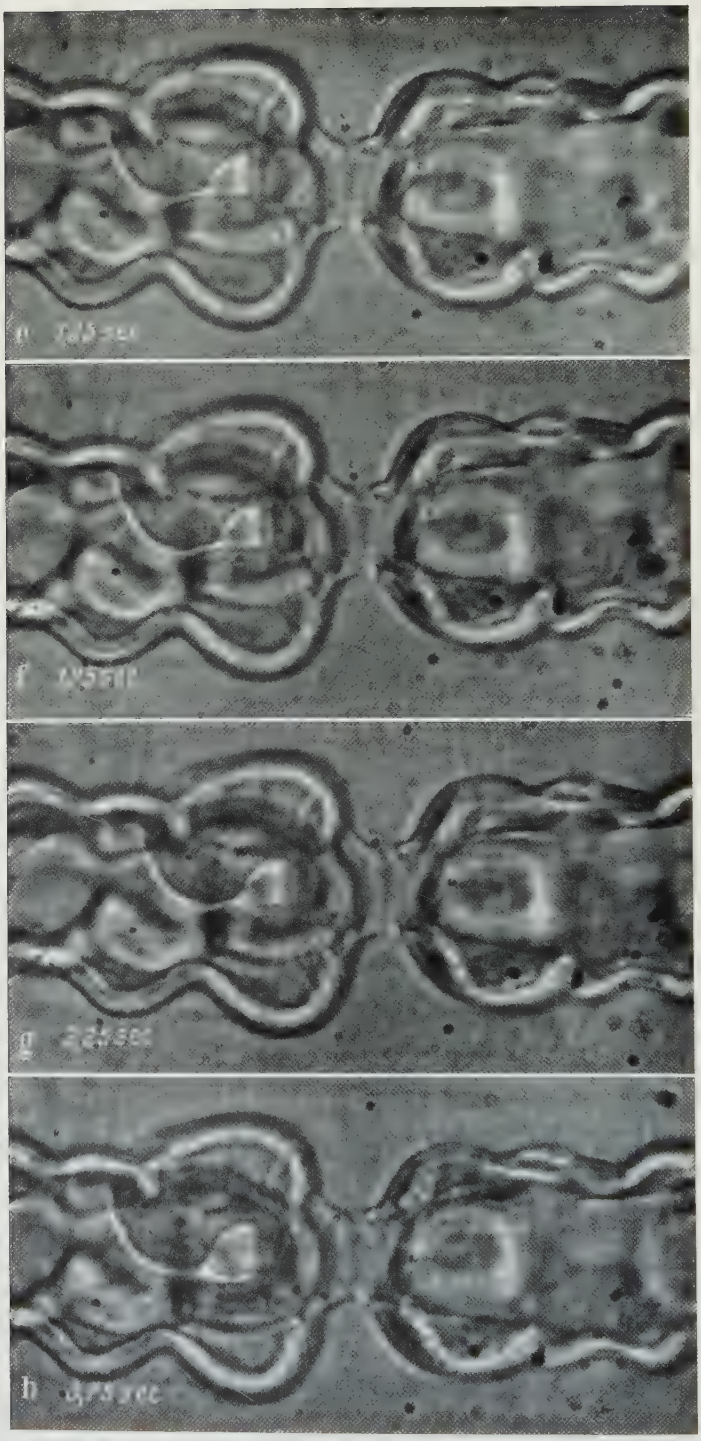


Abb. 6c—h. e 1,25, f 1,75, g 2,25 und h 3,75 sec. Körnige Zeichnung der Markscheidensäume beider Segmentenden, beginnend im nodalen Grenzabschnitt, in die Internodien fortschreitend

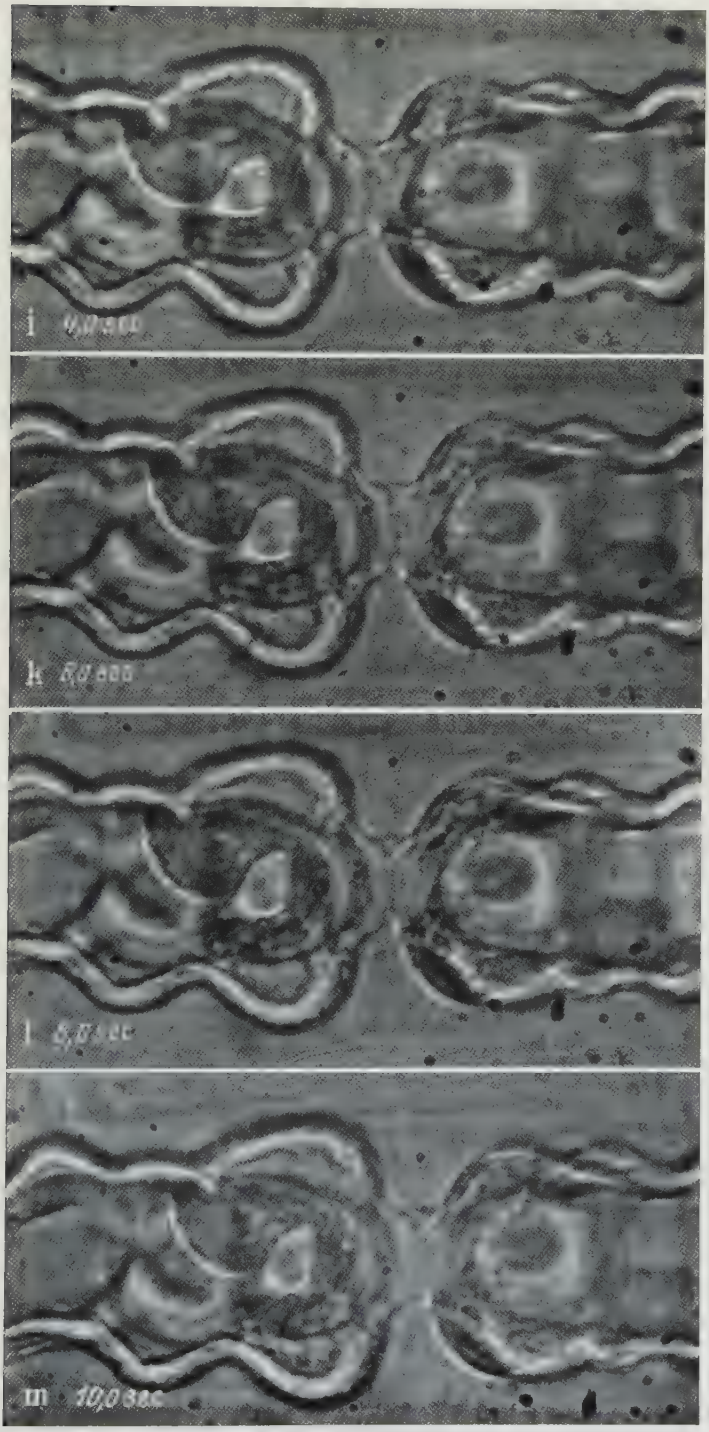


Abb. 6 i—m. i 4,0, k 6,0, l 8,0 und m 10,0 sec. Ausgeprägte körnige Zeichnung im Bereich der Segmentenden. Markkegelgrenzen deutlich erkennbar. Keine Verbreiterung des Spaltraums, keine Myelinabwanderung

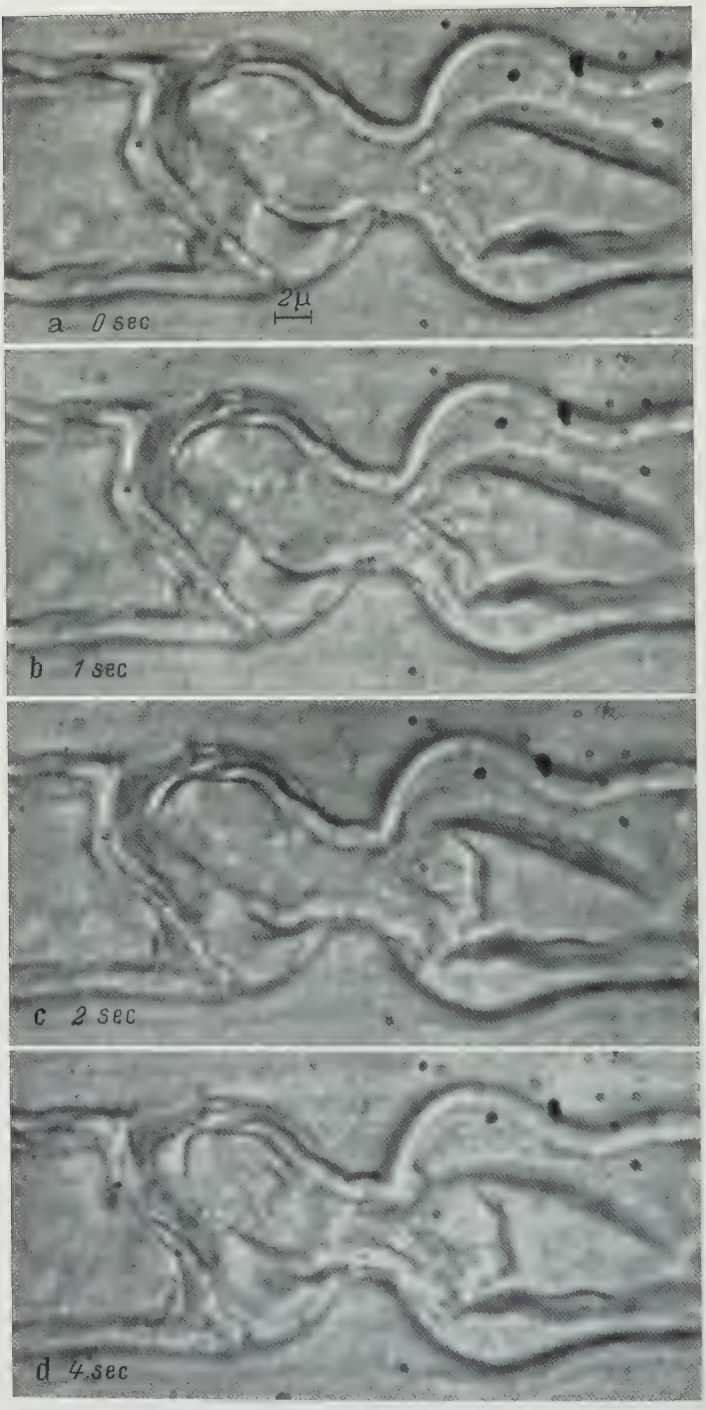


Abb. 7a—m. Rücktransport von übergeflossenem Myelin durch unsymmetrische kathodische Polarisation von 3 V. Die Spannung liegt am gegenüberliegenden Internodium. a Schnürring nach der Zerstörung durch spontanes Überfließen des Myelins von rechts nach links. b 1,0, c 2,0, d 4,0 sec nach Beginn der Polarisation

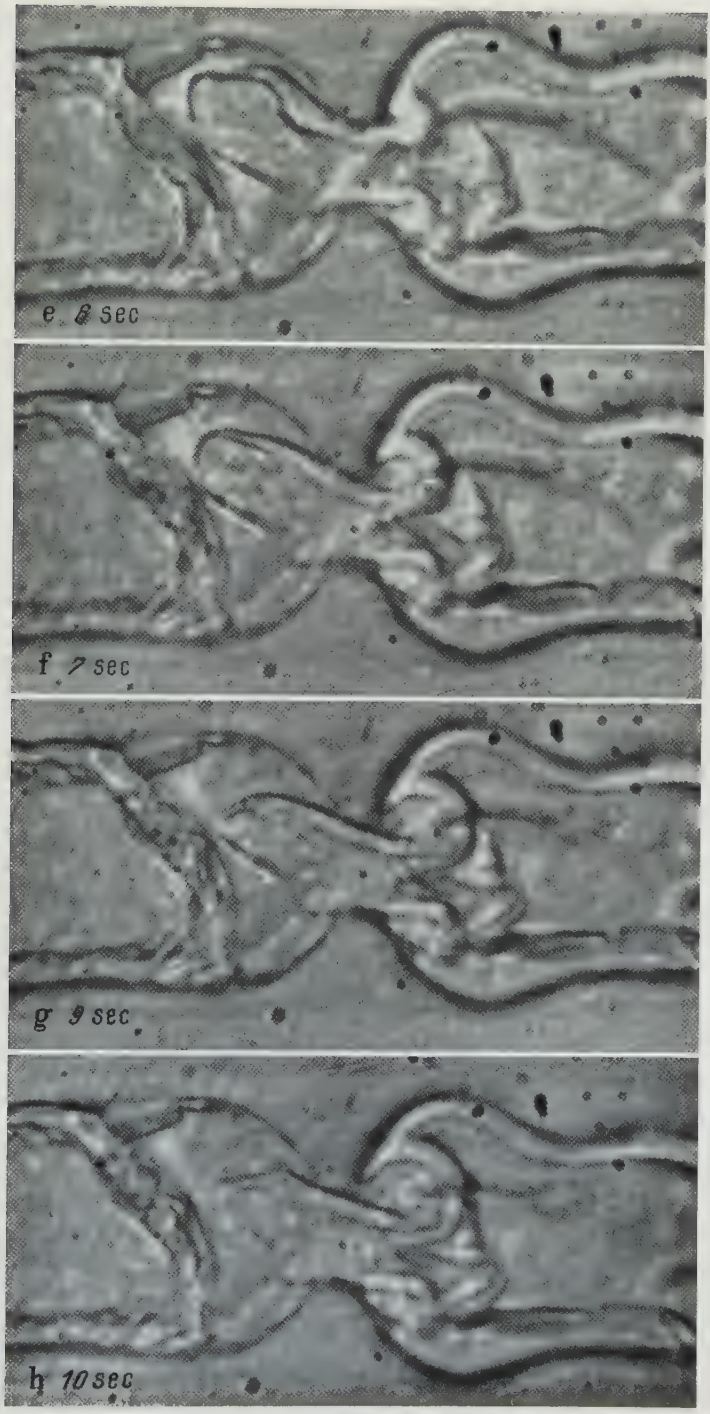


Abb. 7 e—h. e 6,0 sec nach Beginn der Polarisation. Das linksseitige Internodium steht unter Spannung; Kathode am linken Segmentende. Körnige Zeichnung nur des linken Markscheidensaumes, der ursprünglich konkav zum Spaltraum verlaufende Markscheidensaum wölbt sich zunehmend konvex vor und scheint das eingedrungene Myelin aus dem linken Segmentende herauszudrängen. f 7,0, g 9,0, h 10,0 sec

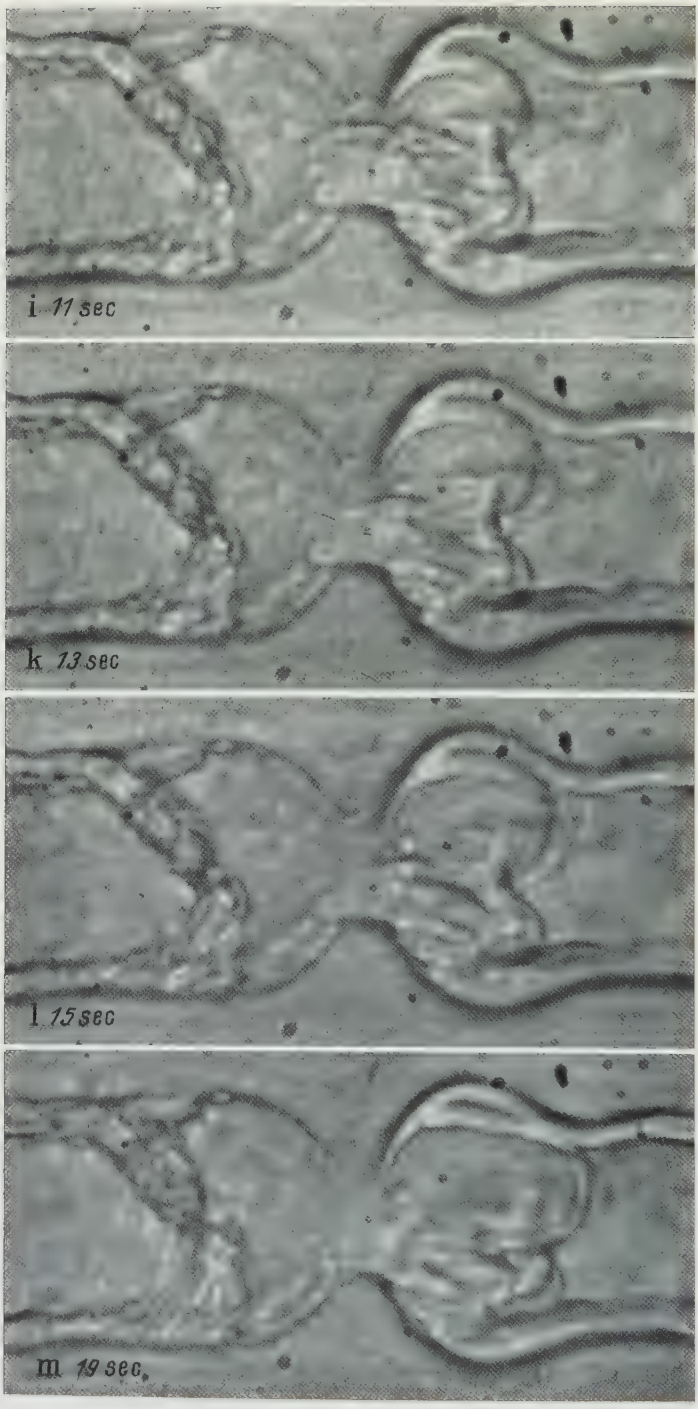


Abb. 7 i—m. i 11,0, k 13,0, l 15,0 und m 19,0 sec. Der linke Markscheidensaum bleibt jetzt am gleichen Ort liegen. Das übergeflossene Myelin zieht sich mit einer konkaven Begrenzung über die rechte Internodalgrenze hinaus weit in das rechte Segmentende zurück

Diese Rückwanderung kann nicht dadurch erfolgt sein, daß das Myelin des „Wirt"-Internodiums bei seiner Wanderung zum kathodisch polarisierten Nachbarschnürring die eingedrungenen Myelinmassen vor sich herschiebt und schließlich vollständig verdrängt, denn die Myelinwanderung verläuft in jedem einzelnen der den Schnürring zusammensetzenden Internodien unabhängig vom anderen. Nur zu Beginn des Stromflusses bewegen sich die Begrenzungen des sich zurückziehenden und des vorwandernden Myelins parallel zueinander (Abb. 7). In der zweiten Phase bleibt das Myelin des Wirtinternodiums, das bereits schollig-körnige Beschaffenheit annimmt, liegen. Die Rückwanderung des übergeflossenen Myelins geht jedoch ungehindert weiter. Sie überschreitet die nodale Grenze, so daß schließlich eine Myelinabwanderung aus dem Segmentende des vorher überfließenden Internodiums einsetzt. Nach Unterbrechung des Stromflusses wandert das Myelin oft wieder in die Ausgangssituation vor Versuchsbeginn zurück. Wahrscheinlich sind das die Fälle, bei denen die Myelinwanderung durch einseitige Innendrucksteigerung der Faser (einseitig stärkere Staudruckbelastung durch strömende Flüssigkeit, oder einseitig stärkeres Trocknen im Luftspalt) ausgelöst wurde.

Fließen an Schnürringen, die durch Myelinüberwanderung zerstört sind, elektrische Ströme in der umgekehrten Richtung (kathodische Polarisation des Schnürrings, Spannung liegt einseitig am überfließenden Internodium, oder anodische Polarisation mit einseitig am gegenüberliegenden Internodium angelegter Spannung), so bleibt das Myelin liegen, oder die Veränderungen, die zur Zerstörung geführt haben, werden noch verstärkt. Die schollig-körnige Denaturierung wird dabei jeweils an dem schnürringnahen Myelin des Internodiums beobachtet, an dem die Reizspannung liegt, gleichgültig, ob es sich in das Ausgangsinternodium zurückgezogen hat oder in das Nachbarinternodium übergeflossen ist.

Morphologische Veränderungen des Schnürrings während der Einwirkung schwacher Ströme

Ebenso regelmäßig wie hohe Spannungen einen irreversiblen Durchschlag des Schnürrings hervorrufen, werden geringe Spannungen, etwa zwischen 10 und 100 mV, mit einer für die Richtung des Potentialgefälles kennzeichnenden Funktionsänderung beantwortet. Eine Polarisation bewirkt ein um die Polarisationsamplitude überhöhtes AP, eine Permeabilitätsabnahme, Schwellenerhöhung und eine verlängerte Repolarisationsphase des AP. Eine Depolarisation dagegen bewirkt ein entsprechend verkleinertes AP, eine Permeabilitätssteigerung, Schwellenerniedrigung und schließlich Unerregbarkeit.

Auch diese durch schwache Ströme hervorgerufenen Funktionsänderungen werden von Veränderungen des mikroskopischen Bildes begleitet. Abgesehen von der Verschiedenheit, die das mikroskopische Bild der einzelnen Schnürringe von vorneherein zeigt, laufen auch Umlagerungsvorgänge an der Struktur nicht mit der Gleichartigkeit ab wie die elektrophysiologischen Erscheinungen. Trotzdem sind die durch schwache Ströme erzeugten morphologischen Veränderungen so charakteristisch, daß sich aus dem mikroskopischen Bild auf die Art des einwirkenden Elektrotonus schließen läßt.

Die Wirkung des *doppelseitigen Anelektrotonus* besteht, ebenso wie die Ca^{++}-reicher Lösungen, in einer Abnahme der Markkegelumfänge und im Zurückweichen

des Myelins aus den Markkegeln. Gewöhnlich rücken auch die nodalen Markkegelgrenzen auseinander, so daß eine Erweiterung des Spaltraums resultiert. Bei Änderungen des Membranpotentials (ΔV_m) von weniger als 35 mV bleibt der normale Aufbau des Schnürrings mit geringfügig erweitertem Spaltraum erhalten. Bei höheren Spannungen verarmen die Markkegel in wenigen Minuten an Myelin, das eine unregelmäßige Oberflächenbeschaffenheit annimmt und schließlich auch aus den Segmentenden abwandert. Wiederholt einwirkender Anelektrotonus ruft zunehmend deutlichere Veränderungen hervor.

Das unter dem Einfluß eines langdauernden Anelektrotonus entstehende Bild gleicht dem als spontan ablaufende Zerstörung des Schnürrings durch Zurückweichen des Myelins beschriebenen und bis auf das Fehlen der schollig-körnigen Plasmadenaturierung im Bereich der Segmentenden auch dem Zustand nach anodischem Durchschlag.

Die durch *einseitigen Anelektrotonus* bewirkten Veränderungen sind die gleichen, beschränken sich jedoch auf das Segmentende, das unter Spannung steht. Nur bei höheren anodischen Spannungen, die 30 mV überschreiten, wird die durch einseitiges Zurückweichen eines Markkegels entstandene Asymmetrie gelegentlich verstärkt, indem der Markkegel des Nachbarsegmentes vorrückt, oder sogar über die Knotenbrücke hinwegfließt.

Ähnliche Wanderungsvorgänge wie beim starken, zum Durchschlag führenden Anelektrotonus entstehen, wenn der einseitig angelegte schwache Anelektrotonus auf einen durch Überfließen des Myelins morphologisch bereits zerstörten Schnürring einwirkt. Unmittelbar nach Einsetzen des einseitig am überfließenden Internodium angelegten schwachen Anelektrotonus (35 mV ΔV_m) verringert die vollständig von Myelin bedeckte, den Schnürring überbrückende Struktur ihren Durchmesser (Abb. 8). Im Verlauf etwa einer Minute zieht sich das übergeflossene Myelin aus dem Nachbarsegment in Richtung auf die Kathode zurück. Die nodale Grenze des übergeflossenen Markkegels rekonstruiert sich, so daß wieder ein schmaler Spaltraum sichtbar wird, der sich langsam verbreitert.

Nachdem der Markkegel wieder seine ursprüngliche Form angenommen hat und der Schnürring sich in einem ähnlichen morphologischen Zustand befindet wie vor der Zerstörung, bleibt der Prozeß stehen. Das ist ein auffälliger Gegensatz zur Rückwanderung des Myelins unter Einwirkung von Durchschlagsspannungen, die ohne Rücksicht auf die ursprünglichen Strukturgrenzen während der ganzen Dauer der Polarisation anhält. Die durch schwachen Elektrotonus bewirkte Rückwanderung des Myelins läuft zudem nicht in wenigen Sekunden ab wie bei Anwendung von Durchschlagsspannungen, sondern benötigt eine bis mehrere Minuten. Der wesentliche Unterschied dieses Vorganges zu einem in Zeitlupe ablaufenden Durchschlag durch starke Polarisation besteht in einer Wiederherstellungder weitgehend verlorengegangenen normalen Anordnung der Strukturelemente im Bereich des Schnürrings.

Dem entspricht eine Normalisierung der Funktion. Während der morphologischen Rekonstruktion vergrößert sich die Amplitude des AP, gleichzeitig verkürzt sich die Repolarisationszeit. Eine ohne Anelektrotonus spontan eintretende morphologische Rekonstruktion wurde bisher noch nicht beobachtet.

Ein *starker Anelektrotonus* (60 mV ΔV_m) bewirkt in gleicher Ausgangssituation ähnliche, jedoch wesentlich rascher ablaufende Vorgänge (Abb. 9). Die

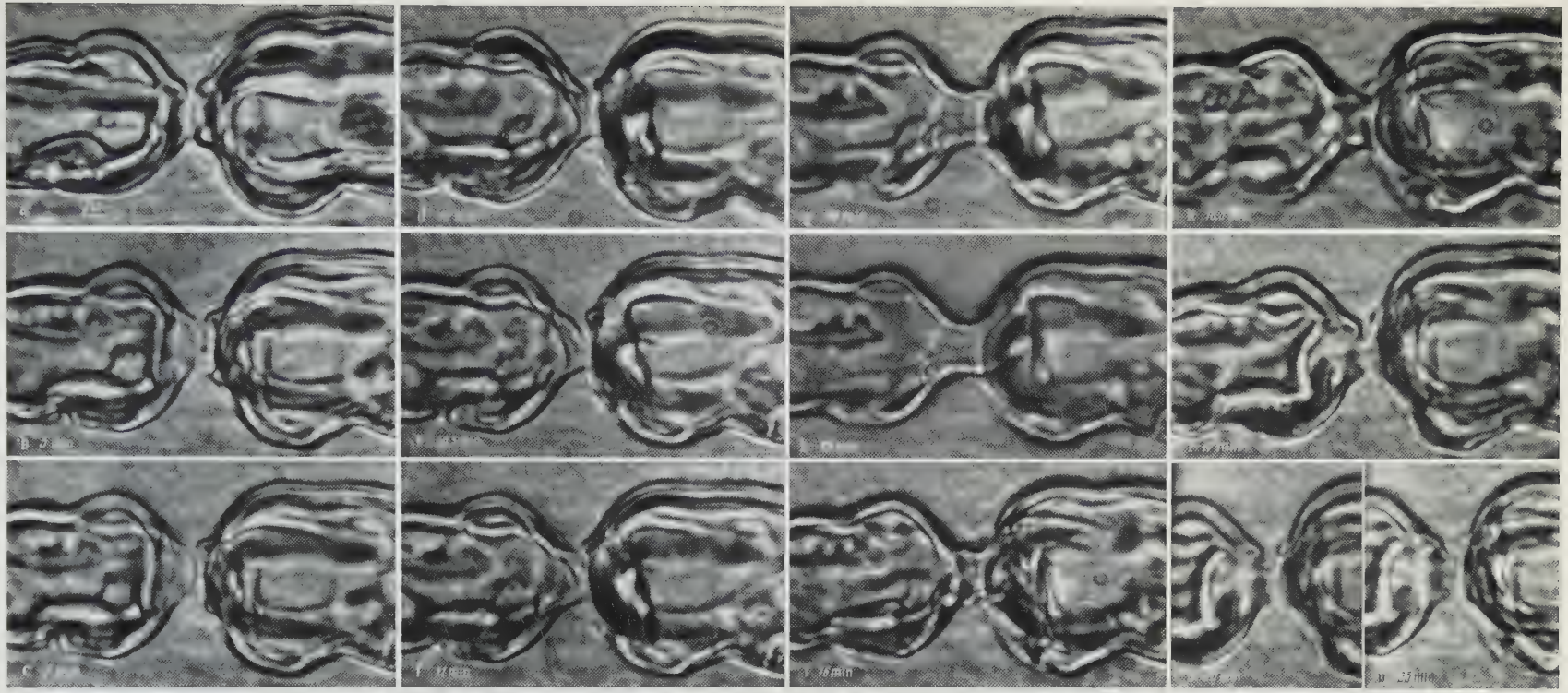


Abb. 8a—n. Restitution eines morphologisch zerstörten Schnürrings durch Polarisation. a Frisch präparierter Schnürring mit intakten Markkegeln und etwas verbreitertem Spaltraum. b 5 min: Unschärfe und Vorwandern des linken Markkegels gegen den Spaltraum. c 7 min: Beginnendes Überfließen des linken Markkegels leitet die morphologische Zerstörung ein. Der rechte Markkegel zieht sich in das Segmentende zurück. d 10 min: Zunehmende Einengung des Spaltraumes durch den überfließenden Markkegel. e 10,5 min, f 11 min: Die nodale Grenze des linken Markkegels verschwindet hinter der nodalen Begrenzung des rechten Segmentendes. g 14 min, h 15 min: Der Spaltraum wird jetzt von einer kontinuierlich durchlaufenden Myelinschicht überdeckt. Der linke Markkegel wandert weiter in das rechte Internodium hinein. i 16 min: 30 sec nach Beginn eines Anelektrotonus von 37 mV. Die Spannung liegt einseitig am linken Internodium. Einengung, Verschmälerung und Segmentierung der Knotenbrücke. Die verstrichene linke Markkegelöffnung tritt wieder deutlich hervor. k 16,5 min: Der linke Markkegel verengt sich weiter und zieht sich aus dem rechten Segmentende zurück. l 17 min, m 20 min und n 25 min: Der linke Markkegel hat sich wieder zu seiner ursprünglichen Form zurückgebildet. Spaltraum jetzt deutlich abgrenzbar

Spitze des weit in das Nachbarinternodium eingedrungenen Myelinkeiles hat sich schon nach 20 sec zurückgezogen. In weiteren 40 sec rekonstruiert sich der links-

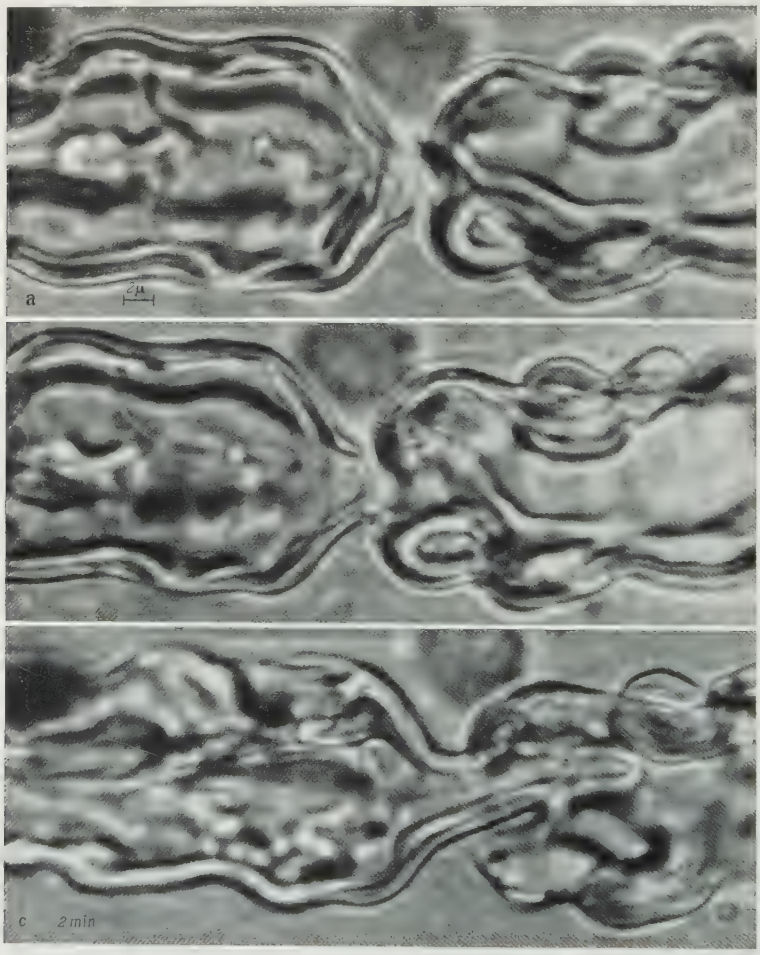


Abb. 9a—h. Wirkung eines Anelektrotonus von 60 mV. a, b 1 min: Frisch präparierte Nervenfaser. Zunehmende Verschiebung des Spaltraums nach rechts durch Vorwandern des linken Markkegels. Oberhalb des Spaltraums ein hinter der Einstellebene liegender Bindegewebskern. c 2 min: Der zungenförmig verlängerte linke Markkegel dringt weit in das rechte Segmentende ein. d 3,5 min: 30 sec nach Beginn des Anelektrotonus von 60 mV (Strom fließt zwischen dem sichtbaren Schnürring und den links davon gelegenen). Die Spitze des vorgewanderten Myelinkegels zieht sich zurück. Parallelstellung der Markscheidensäume im Bereich der Knotenbrücke. (Die senkrecht zur Faserachse verlaufende Streifung über dem rechten Segmentende scheint von den orthograd getroffenen nodalen Myelinlamellen, Mesaxonen nach Robertson, zu stammen.) e 4,0 min: Segmentierung der Knotenbrücke. f 4,5 min: Deutlich sichtbare Spaltraumbegrenzungen. Ein schmaler doppelwandiger Myelinausläufer reicht noch in das rechte Segmentende hinein. g 5 min, h 6 min: Bei Fortdauer des starken Anelektrotonus hält die Bewegung des Myelins von rechts nach links an — also umgekehrt wie vor dem Anelektrotonus. Das aus dem rechten Internodium vordringende Myelin bricht in das linke Segmentende ein

seitige Markkegel bis auf den unteren Abschnitt, dessen Myelinanteile als schmales, doppelwandiges Fragment im Wirtinternodium liegengeblieben sind.

Im Gegensatz zum vorhergehenden Beispiel bleibt der Prozeß jedoch nicht in dieser Phase einer weitestgehenden Wiederherstellung stehen. Der wandernde

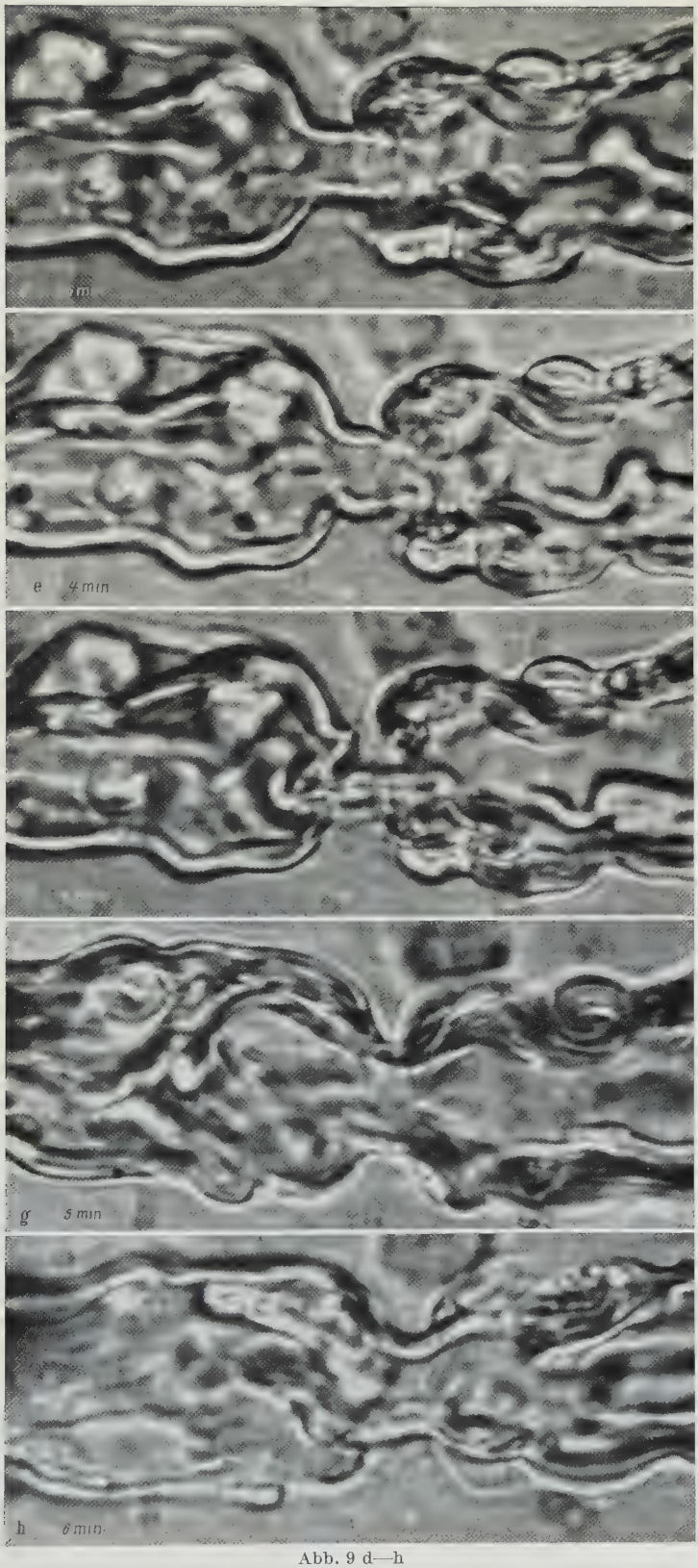


Abb. 9 d—h

Markkegel zieht sich weiter in das Segmentende zurück, beschleunigt durch den Einbruch von Myelinmassen, die aus dem Nachbarinternodium hinter dem sich zurückziehenden Markkegel vorwandern. Durch den starken Anelektrotonus ist eine Umkehrung in der Wanderungsrichtung des Myelins eingetreten.

Die durch *Katelektrotonus* hervorgerufenen morphologischen Veränderungen verlaufen in der umgekehrten Richtung. Durch Zusammenrücken der nodalen Markkegelgrenzen entsteht eine Verschmälerung des Spaltraums. Eine nodalwärts gerichtete Myelinwanderung wird besonders an Schnürringen deutlich, an denen ein spontan ablaufender Zerstörungsprozeß, oder eine Vorpolarisation zum Auseinanderweichen des Myelins geführt hat. Außerdem verringert sich der Abstand zwischen den Linien der im myelinfreien Bereich sichtbaren Doppelkontur. Gewöhnlich bewirkt die Depolarisation eine verwaschene Zeichnung oder ein Verschwinden der Doppelkontur, die danach erst wieder während eines Anelektrotonus deutlich hervortritt.

Während der Anelektrotonus eine Festigung der intakten Strukturen hervorruft, entsteht unter dem Einfluß des Katelektrotonus eine Instabilität. Wird der Katelektrotonus zu Beginn des Versuches gegeben, so tritt die Zerstörung des Schnürrings durch Myelineinbruch in das Nachbarinternodium besonders häufig und frühzeitig ein.

Besprechung der Ergebnisse

Die am bespülten Schnürring „spontan" ablaufenden Zerstörungsvorgänge bestehen entweder im Überfließen oder Auseinanderweichen des Myelins. Sie wurden bereits früher als Folgen einer Schädigung durch $Ca^{\cdot\cdot}$, $K^{\cdot}$-reiche und anisosmotische Lösungen beschrieben. Das „stabilisierende" $Ca^{\cdot\cdot}$ führte am Schnürring zum Auseinanderweichen, das „auflockernde" $K^{\cdot}$ und hypotonische Lösungen zum Überfließen des Myelins. In den vorliegenden Untersuchungen wurden diese Zerstörungsvorgänge zunächst ohne Rücksicht auf die möglichen Ursachen im Zusammenhang mit den gleichzeitig auftretenden Funktionsänderungen betrachtet.

Die Zerstörung durch Überfließen beginnt meist mit einer Strukturauflokkerung des überfließenden Markkegels, die im mikroskopischen Bild als Verschwimmen der Umrißzeichnung erscheint. Eine sichere topographische Orientierung über die räumlichen Umlagerungen der während der Zerstörung auftretenden Massenverschiebungen ist bislang noch nicht möglich.

Bemerkenswert ist, daß die nodale Einschnürung am ursprünglichen Ort bestehen bleibt, selbst wenn das nodale Axon vollständig von Myelin verdeckt erscheint. Also scheidet die Möglichkeit aus, daß das Myelin die den Axonabschnitt bedeckende Schicht Schwannschen Cytoplasmas (nodales Plasmakompartiment) durchdringt und in den Perinodalraum einbricht. In diesem Fall müßte die Einschnürung ausgeglichen werden. Wahrscheinlich bahnt sich das Myelin seinen Weg zwischen der Axonoberfläche und der inneren Oberfläche des Plasmakompartiments. Das wäre der gleiche Weg, den eine unter die Markscheide injizierte Flüssigkeit nimmt, die ohne wesentlichen Widerstand am Schnürring leicht zum Nachbarsegment überfließt (de Renyi 1929, Nagel 1936, Schneider 1952).

Nach den Aufnahmen Robertsons (1959) zu urteilen, ist dieser Weg durch Aufsplitterung der im Internodium verklebten Oberflächenstrukturen am Schnürring schon vorgebildet. Am Ende der innersten Myelinlamelle spaltet sich die axon-Schwann-membrane auf und das hypothetische Axolemm (axon-membrane, Robertson), dessen Existenz von Stoeckenius und Zeiger (1956) bezweifelt, von Scharf (1951, 1952) ganz abgelehnt wird, läuft isoliert weiter. Die innere Oberfläche des Plasmakompartiments nähert sich der nunmehr myelinfreien Axonoberfläche, ohne sie jedoch zu berühren.

Obwohl dieser Hohlraum in den Aufnahmen Robertsons oft sogar mit dem Perinodalraum über eine offene Nahtlinie zwichen den am Schnürring miteinander verzahnten Schwannzellen benachbarter Segmente (Ranvier 1884) in Verbindung steht, erscheint es fraglich, ob diese Hohlräume als präexistent angesehen werden dürfen. Doch selbst wenn die erwähnten Strukturen intravital ohne dazwischenliegende Hohlräume aneinanderhaften, scheinen sie sich jedoch leicht voneinander trennen zu lassen.

Um das Verhalten des Schwannschen Plasmakompartiments während der Myelinwanderung zu ermitteln, benutzten wir die Möglichkeit seiner Markierung durch Anfärben der in ihm enthaltenen granulären Gebilde. Die im Beginn des Überfließens mit Janusgrün angefärbten Granula wandern zunächst zusammen mit dem überfließenden Markkegel bis die nodale Grenze des Nachbarinternodiums erreicht oder nur um wenige Mikron überschritten ist (Abb. 3). Während des Überfließens wird das Kompartiment entweder sofort vom Myelin unterwandert und auf dem Markkegel liegend mitgezerrt, oder erst bis zum Erreichen des Nachbarsegmentes vor dem Markkegel hergeschoben. Im nodalen Grenzbereich des Nachbarsegmentes tritt die Unterwanderung spätestens ein; dort bleiben die Granula liegen, während das Myelin weiter in das Segmentende vordringt. Während der Zerstörung durch Auseinanderweichen des Myelins bleiben die janusgrün-positiven Granula an ihrem ursprünglichen Ort im Spaltraum.

Die elektrische Aktivität des Schnürrings besteht selbst dann weiter, wenn er morphologisch schon weitgehend zerstört erscheint. Neben der Schwellenerhöhung und Amplitudenverkleinerung verzögert sich die Repolarisation des AP schon im frühesten Beginn des Überfließens. Wie entsteht diese Vergrößerung der Zeitkonstante? Im Beginn des Überfließens wird die für die freie Diffusion verfügbare Fläche der Membran durch Myelinüberlagerung verkleinert. Während des Überfließens verlängert sich der Diffusionsweg zu der im Spaltraum liegenden, von Myelin ursprünglich unbedeckten Axonoberfläche, die als erregbare Membran angesehen wird, gleichgültig, ob der Perinodalraum oder das Schwannsche Plasmakompartiment als Reservoir der für die phasischen Potentialänderungen notwendigen Elektrolyte in Betracht gezogen wird.

Da die gleiche Verzögerung des Repolarisationsvorganges jedoch auch beim Auseinanderweichen des Myelins auftritt, schaltet die Möglichkeit aus, die vergrößerte Zeitkonstante generell mit dem verlängerten Diffusionsweg oder der Verkleinerung der wirksamen Membranoberfläche in Zusammenhang zu bringen.

Ähnliche Wanderungsvorgänge des Myelins werden bei Einwirkung elektrischer Ströme beobachtet. Der stabilisierende Anelektrotonus bewirkt das Auseinanderweichen, also die Abwanderung des Myelins in Richtung auf die depolarisierten Nachbarschnürringe und eine Erweiterung des Spaltraums, der Katelektrotonus

dagegen eine zentripetale zum Schnürring gerichtete Wanderung, das Überfließen und eine Verkleinerung des Spaltraums. Da das Myelin regelmäßig in kathodischer Richtung wandert, lassen sich beliebige Wanderungsvorgänge am Schnürring hervorrufen, bzw. eingetretene unterbrechen oder rückgängig machen.

Durch Anelektrotonus von 20–50 mV gelingt es in einer bis mehreren Minuten eine spontan durch Überwanderung eingetretene Zerstörung des Schnürrngs rückgängig zu machen. Dem entspricht die in der Elektrophysiologie bekannte Tatsache, daß ein Anelektrotonus nicht nur stabilisierend auf die Funktionsfähigkeit des intakten Schnürrings wirkt, sondern darüber hinaus funktionell geschädigte Nervenfasern, die keine oder nur stark verzerrte AP abgeben, in Nervenfasern mit nahezu normaler Funktion zurückverwandeln kann.

Dieser Restitutionsvorgang läuft also um so schneller ab, je höher die Polarisationsspannung ansteigt. Oberhalb 50 mV Membranpolarisation treten jedoch morphologische Schädigungen des Schnürrings auf. Überschreitet das Membranpotential etwa den doppelten Wert des Ruhepotentials, so bricht der Membranwiderstand zusammen und die Erregbarkeit erlischt irreversibel, die Membran schlägt durch (Rudolph und Stämpfli 1958).

Die Myelinbewegung scheint auf echten elektrokinetischen Vorgängen zu beruhen, denn unbeeinflußt durch Veränderungen bzw. durch die Zerstörung der Membranfunktion bleibt die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der Höhe der angelegten Spannung, die der Wanderungsrichtung von der Polarität auch bei steigenden Durchschlagspannungen bestehen. Höhere Spannungen als 500 mV bewirken neben den heftigen Myelinverschiebungen, die zur augenblicklichen Zerstörung des Schnürrings führen, eine deutliche Verkürzung der Faser. Diese Verkürzung scheint von den anodisch polarisierten Abschnitten der Faser auszugehen, denn ein symmetrischer Katelektrotonus, bei dem die Nachbarschnürringe unter dem Einfluß der Anode stehen, verursacht eine stärkere Verkürzung der Faser als ein symmetrischer Anelektrotonus.

Auf Grund entgegengesetzter Wanderungsrichtung wird der Zusammenbruch der Membranfunktion von unterschiedlichen morphologischen Folgeerscheinungen begleitet, je nachdem ob ein anodischer oder kathodischer Durchschlag stattgefunden hat. Während der kathodischen Polarisation eines intakten Schnürrings bleibt das Myelin am gleichen Ort liegen. Abgesehen von der schollig-körnigen Denaturierung des Myelins, die im Bereich der Markkegel beginnt und sich in die Segmentenden fortsetzt, treten nur geringfügige Veränderungen des mikroskopischen Bildes auf.

Dagegen hinterlassen anodische Durchschläge wegen der stark beschleunigten Myelinabwanderung aus Markkegeln und Segmentenden auch an widerstandsfähigen intakten Schnürringen wesentlich ausgeprägtere morphologische Zerstörungen. Das dürfte abgesehen von dem stärkeren Spannungsabfall, den ein positiver Impuls an der Membran hervorruft, für die Tatsache von Bedeutung sein, daß sich ein irreversibler Zusammenbruch des Membranpotentials durch anodische Polarisation schon mit wesentlich geringeren Spannungen erzielen läßt als durch kathodische. Da die schweren morphologischen Veränderungen, gleichgültig ob sie durch schollige Denaturierung während eines kathodischen oder durch Myelinabwanderung während eines anodischen Durchschlags entstanden sind, nur am Spaltraum selbst und im Bereich der Segmentenden auf-

treten und sich nicht in die Internodien fortsetzen, tritt die anatomische Sonderstellung des Schnürrings während der elektrischen Zerstörung besonders deutlich in Erscheinung.

Als mögliche Ursachen der Myelinwanderung müssen verschiedene elektrokinetische Vorgänge in Betracht gezogen werden:

1. Eine Änderung der elektrostatisch bedingten *Oberflächenkräfte.*

Das Myelin, das seine Abgrenzung nicht nur der umgebenden Schwannzelle, sondern auch seinen eigenen, sehr starken Oberflächenkräften verdankt, stellt auf Grund der kristallinen Anisotropie und der hohen Konzentration des Baumaterials ein wirksames Dielektrikum dar und ist als solches leicht polarisierbar. Änderungen der Ladungsdichte oder des Ladungsvorzeichens können das Myelin direkt über kapillarelektrische Volumänderungen in Bewegung setzen. Während des Anelektrotonus müßte nach dieser Erklärung eine Entladung zur Zunahme der Oberflächenspannung und damit zur Volumenverminderung des Myelins führen. Eine andere Erklärung bestünde in der Annahme, daß nicht das Myelin selbst, sondern die Schwannzelle, oder das Axon, oder beide gleichzeitig durch Änderung der Oberflächenspannung ihr Volumen ändern und auf diese Weise den für das Myelin verfügbaren Raum einschränken oder vergrößern. Während des Anelektrotonus würde eine Verkleinerung des durch diese Strukturen eingenommenen Raumes das Auseinanderweichen des Myelins erklären, das der Tendenz, sich zur Kugel abzurunden, folgt und sich auf kleinerem Raum zusammenzieht. Umgekehrt würde eine kathodische Kontraktion der umgebenden Struktur das Myelin zwingen, Raum freizugeben und sich auf eine größere Strecke zu verteilen. Eine Entscheidung darüber, ob das eine oder andere eine wesentliche Rolle bei den Wanderungsvorgängen spielt, ist schwer zu treffen.

2. Als weitere Erklärungsmöglichkeit wird die *Elektrophorese* erwogen.

Die Diskussion der Frage, ob eine Wanderung im elektrischen Feld vorliegen könnte, setzt die Kenntnis der Teilchenladung voraus. In Elektrolytfällungsreihen verhalten sich die aqua dest.-suspendierten, doppelbrechenden Myelinscheidenbestandteile eindeutig wie ein negatives Sol (Müller-Mohnssen 1960). Auch die zur Anode gerichtete Wanderung im elektrischen Feld spricht für eine negative Teilchenladung. Werden die ebenfalls durch mechanische Zertrümmerung in der Schlagkreuzmühle gewonnenen Myelintröpfchen dagegen in Ringerlösung suspendiert, so wandert die Mehrzahl der Teilchen zur Kathode. Es hat den Anschein, als ob eine Umladung der vorher negativen Teilchen durch Kationenadsorption stattgefunden hat. Da das einzelne doppelbrechende Teilchen bei der Vielfalt des in dem Homogenisat zusammenkommenden Materials nicht mit Sicherheit als Myelin angesprochen werden darf, einige wenige Teilchen auch in entgegengesetzter Richtung wandern und keine ausreichend gepufferte Lösungen verwendet werden konnten, leistet diese letztere Methode jedoch keine beweiskräftige Aussage über die Teilchenladung. Daher muß die positive Teilchenladung, die für eine elektrophoretische Wanderung des Myelins in der stromdurchflossenen Faser sprechen könnte, als unsicherer Befund gewertet werden. Gegen eine Elektrophorese des Myelins als auslösender Mechanismus spricht, daß die Längswiderstände der Myelinscheide gegenüber denen des Axons zu groß sind, um einen nennenswerten Stromfluß durch die Myelinscheide zu gestatten, der die beträchtlichen Myelinverschiebungen als Ladungstransport erklären könnte.

3. Eigene Befunde und Hinweise aus der Literatur geben der Erklärung, daß die *Elektroendosmose* für die Myelinwanderung verantwortlich ist, den Vorrang. Hill und Keynes (1949) beobachteten am Krebsnerven eine Zunahme der Lichtdurchlässigkeit an der Kathode, die auf eine vermehrte Hydratation und eine anodische Opazität, die auf eine Dehydratation zurückgeführt wurde. Tobias (1951) beobachtete das gleiche auch am Gesamtnerven des Frosches. Er vermutete eine Strömung von Zellwasser von der Anode zur Kathode durch Elektroendosmose.

Auch in unseren Experimenten an Einzelfasern fanden sich Anhaltspunkte für eine zur Kathode gerichtete Wasserbewegung, vornehmlich im Axon. Da die

Strömung kräftig genug ist, auch gröbere Myelinkugeln von 3—5 μ Durchmesser mit Geschwindigkeiten von etwa 15 μ/sec mitzureißen, scheint es naheliegend, elektroendosmotische Zellwasserströmungen als eigentliche Ursache der Myelinbewegung anzusehen. Bei der hohen Konzentration frei beweglicher Ionen im Zellinneren wird der Anteil einer elektrolytischen Wasserüberführung an der Wasserströmung nicht unbeträchtlich sein (Hydratwasser und das durch Ionenreibung mitgeführte Wasser).

Es ist nicht ausgeschlossen, daß ein rein methodisch bedingter Anteil bei der Wasserströmung eine gewisse Rolle spielt. Der Flüssigkeitsverlust des den Spaltraum überbrückenden Faserabschnittes mag neben Veränderungen der Oberflächenspannung zum Teil auf einer beschleunigten Verdunstung durch Joulesche Wärme beruhen, die im Zusammenhang mit der großen Stromdichte an der Faseroberfläche im Bereich des Spaltraums auftritt. Ein Wassertransport aus den übrigen Faserabschnitten in die austrocknende Region kann sich zwar an einer elektroosmotischen Strömung beteiligen, ist jedoch nicht in der Lage, die Abhängigkeit der Strömungsrichtung von der Polarität zu erklären. Durch vergleichende Untersuchungen mit einer auf den Luftspalt verzichtenden Methode (Meves und Stämpfli 1960) muß ermittelt werden, ob dieser durch die Luftspaltmethode bedingte Anteil an der Zellwasserströmung wirklich vorhanden und wie groß er ist.

Eine Bewegung des Dispersionsmittels durch die ruhende disperse Phase ist im Falle der Nervenfaser, die durch das Endoneurium, die Schwannzelle und andere Stützelemente auch während des Stromflusses ihre äußere Form beibehält, leicht verständlich. Von dem schädigenden Einflüssen eines elektrischen Stromes wird innerhalb der Faser zunächst die Struktur betroffen, die als Kabel dient, aber wegen ihres Wasserreichtums mechanisch empfindlich ist, also das Axon. Die normalen Zusammenhänge zwischen dem Axon und den übrigen Einzelstrukturen, vornehmlich der Myelinscheide, werden dort am meisten in Mitleidenschaft gezogen, wo sie am leichtesten störbar und wo die Stromdichte im Axon am größten ist, also am Schnürring.

Die normale Stabilität des ungeschädigten Schnürrings setzt der regellosen Abwanderung einen Widerstand entgegen. Die Myelinbewegung setzt erst mehrere Sekunden nach Beginn des Durchschlags langsam ein und erfährt im Laufe mehrerer Sekunden allmählich die endgültige Beschleunigung. An einem intakten Schnürring muß die Durchschlagsspannung länger einwirken, um Bewegungsvorgänge gleicher Ausdehnung und Geschwindigkeit hervorzurufen wie an einem geschädigten. Bereits eine als unregelmäßiger Verlauf der nodalen Grenze kaum wahrnehmbare Schädigung eines Markkegels beeinträchtigt die Festigkeit. Auch während eines symmetrischen Durchschlags fließt das Myelin des betroffenen Markkegels regellos und stark beschleunigt ab, so daß eine unsymmetrische Verformung des Schnürrings entsteht.

Nachdem die Haftpunkte zwischen den verschiedenen Bauelementen am Schnürring durch elektroendosmotische Flüssigkeitsströmungen, durch Zerrung der Faser während der Verkürzung und ungleicher elektrokapillarer Volumenänderungen geschädigt sind, kann das elektrische Feld direkt an den nunmehr mobilisierten Myelinteilchen angreifen und die Bewegung durch Elektrophorese unterstützen.

Für die Gültigkeit der Vorstellung, die der Elektroendosmose den Hauptanteil am Zustandekommen der Myelinströmung einräumt, spricht die Möglichkeit, durch Überfließen in das Nachbarinternodium eingedrungenes Myelin mit einer einseitigen kathodischen Polarisation des zerstörten Schnürrings zu verdrängen, wenn die Spannung einseitig an diesem Nachbarinternodium angelegt wird. Die zum Schnürring gerichtete Zellwasserströmung, die in dem stromdurchflossenen Internodium einsetzt, wird an der Stromaustrittsstelle — dem Schnürring — nicht abrupt unterbrochen, sondern setzt sich über den Schnürring hinweg in das Internodium fort, aus dem die übergewanderten Myelinanteile stammen und führt so zum Rücktransport des Myelins. Die Rückwanderung tritt auch dann ein, wenn sich das Myelin des stromdurchflossenen Nachbar-

internodiums nicht mitverschiebt. Innerhalb des Internodiums, an dem die geringste Spannung liegt, findet in diesem Fall die stärkste Myelinverschiebung statt, ein Zeichen dafür, daß die Myelinbewegung weniger durch Elektrophorese als durch mechanische Ursachen, etwa durch Kapillarkontraktion des Nachbarinternodiums, oder durch Wasserströmung im Axon zustande kommt. Zusammen mit der durch Fällungsreihen nachgewiesenen negativen Teilchenladung der Nerveneiweißkörper spricht außerdem die Richtung der Wasserströmung zur Kathode für die Elektroosmose.

Zusammenfassung

Die morphologischen und funktionellen Veränderungen des einzelnen Schnürrings während der „spontan" ablaufenden Zerstörung und während des starken und schwachen Elektrotonus wurden gleichzeitig registriert. Folgende Zusammenhänge wurden festgestellt:

1. Die nach langdauernden Experimenten auftretende morphologische Schädigung des Schnürrings besteht entweder im *Überfließen* des Myelins über den Spaltraum hinweg in das benachbarte Internodium, oder im *Zurückweichen* aus Markkegeln und Segmentenden. Beide Formen werden von den gleichen Veränderungen des Aktionspotentials (AP) begleitet. Geringste morphologische Veränderungen beeinträchtigen bereits die Funktion, erkennbar am abweichenden Verlauf des AP. Dagegen bleibt die phasische Aktivität des Schnürrings auch nach weitgehender Zerstörung seiner normalen morphologischen Beschaffenheit erhalten.

2. *Anelektrotonus* bewirkt eine Erweiterung des Spaltraums, *Katelektrotonus* eine Verschmälerung. Beides entsteht durch Myelinwanderung zur Kathode. Der Erfahrung, daß die Funktion eines geschädigten Schnürrings durch Anelektrotonus verbessert werden kann, entspricht folgende Beobachtung an spontan, durch Überfließen des Myelins geschädigten Schnürringen: ein einseitig am überfließenden Internodium angelegter Anelektrotonus bewirkt eine Rückwanderung des Myelins und eine Wiederherstellung des normalen mikroskopischen Bildes.

3. Überschreitet der Elektrotonus ein ΔV_m von 80—100 mV, so bricht das Ruhepotential zusammen und die Aktivität erlischt. Gleichzeitig wird die normale Anordnung der nodalen Strukturen durch stark beschleunigte Myelinverschiebungen irreversibel zerstört. Die Geschwindigkeit der Myelinwanderung bleibt auch nach dem Funktionsverlust von der Höhe der angelegten Spannung, die Richtung von der Polarität abhängig. Die Ursachen dieser elektrokinetischen Vorgänge werden diskutiert.

Meinem „alten" Chef, Herrn Prof. Stämpfli, der mit Rat und Anregungen nie geizig war und bei der technischen Ausführung jederzeit seine Hilfe zur Verfügung stellte, verdanke ich den größten Anteil an meinen Arbeiten.

Literatur

Hill, D. K., and R. D. Keynes: Opacity changes in stimulated nerve. J. Physiol. (Lond.) **108**, 278—281 (1949).

Meves, H., u. R. Stämpfli: Die Registrierung der Aktionspotentiale bespülter Ranvierscher Schnürringe mit der Gegenkopplungsmethode. Helv. physiol. pharmacol. Acta **18**, C 38 bis C 40 (1960).

Müller-Mohnssen, H.: Morphologische Veränderungen des überlebenden Ranvierschen Schnürrings unter Einwirkung anisosmotischer Außenlösungen. Z. Zellforsch. **49**, 287—318 (1959).

Müller-Mohnssen, H.: Der Einfluß elektrophysiologisch wirksamer Substanzen auf das mikroskopische Bild des überlebenden Ranvierschen Schnürrings. Z. Zellforsch. **52**, 9—26 (1960).

– Kolloidchemische Untersuchungen zum Studium der Elektrolyt- und p_H-Wirkung auf den Quellungszustand markhaltiger Nervenfasern. Z. Zellforsch. **52**, 27—44 (1960).

Nagel, A.: Die mechanischen Eigenschaften der Bindegewebshüllen peripherer Nervenfasern, sowie der Myelinscheide und der Ranvierschen Schnürringe. Z. mikr.-anat. Forsch. **39**, 415—426 (1936).

Ranvier, L.: In Cornil u. Ranvier, Manuel d'histologie pathologique, p. 35. Paris 1884.

Renyi de G. St.: The structure of cells in tissues as revealed by microdissection. III. Observations on the sheaths of myelinated nerve fibres of the frog. J. comp. Neurol. **48**, 293—310 (1929).

Robertson, J. D.: Preliminary observations on the ultrastructure of Nodes of Ranvier. Z. Zellforsch. **50**, 553—560 (1959).

Rudolph, G., u. R. Stämpfli: Anodenöffnungserregungen einzelner Ranvier-Schnürringe. Pflügers Arch. ges. Physiol. **267**, 524—531 (1958).

Scharf, J. H.: Die markhaltigen Ganglienzellen und ihre Beziehungen zu den myelogenetischen Theorien. Morph. Jb. **91**, 187—252 (1951).

Schneider, D.: Die Dehnbarkeit der markhaltigen Nervenfaser des Frosches in Abhängigkeit von Funktion und Struktur. Z. Naturforsch. **7b**, 38—48 (1952).

Stämpfli, R.: Die Stromspannungscharakteristik der erregbaren Membran eines einzelnen Schnürrings und ihre Abhängigkeit von der Ionenkonzentration. Helv. physiol. pharmacol. Acta **16**, 127—145 (1958).

–, and M. Willi: Membrane potential of a Ranvier Node measured after electrical destruction of its membrane. Experientia (Basel) **13**, 297 (1957).

Stoeckenius, W., u. K. Zeiger: Morphologie der segmentierten Nervenfaser. Ergebn. Anat. Entwickl.-Gesch. **35**, 420—548 (1956).

Tobias, J. M.: Qualitative observations on visible changes in single frog, squid, and other axons subjected to electrical polarization. J. cell. comp. Physiol. **37**, 91—103 (1951).

— Further studies on the nature of the excitable system in nerve. I. Voltage-induced axoplasm movement in squid axons. J. gen. Physiol. **43**, 57—61 (1960).

Dr. H. Müller-Mohnssen, Institut für Strahlenschutzforschung, Neuherberg bei München, Ingolstädter Landstr. 1

Zeitschrift für Zellforschung 54, 499—510 (1961)

Institute of General Zoology, University of Copenhagen
(Head: Prof. H. V. Brøndsted, Ph.D.)

ULTRASTRUCTURE OF THE COLLAR OF THE CHOANOFLAGELLATE *CODONOSIGA BOTRYTIS* (EHRENB.)

By

Ejnar Jules Fjerdingstad*

With 8 Figures in the Text

(Received February 20th, 1961)

Introduction

The *Craspedomonadacea* or choanoflagellates are provided with a very delicate 'collar' surrounding the basal part of the flagellum. The structure of this collar has been the subject of much discussion. Most authors describing the collar have considered it to be a plasmatic membrane (James-Clark 1868, Bütschli 1878, Stein 1878, Kent 1880—1882, Lapage 1925). Other investigators have modified this view to the extent of considering the collar as formed by a rolled-up sheet of cytoplasm (Schouteden 1905, Ehrlich 1908). Contrary to this opinion some authors employing special staining methods found the collar to be fibrillar (Griessmann 1914, Petersen 1929). However, this view was not accepted generally, presumably because the fibrils were considered to be artifacts, and in recent textbooks (Doflein and Reichenow 1953, Hall 1953) one may still see the collar described as a funnel shaped plasmatic membrane.

However, the controversy was definitely settled in 1954 when Petersen and Hansen with the electron microscope demonstrated, that the collar of *Codonosiga botrytis* was formed by "a ring of very fine soft tentacles".

The investigation of Petersen and Hansen (1954) was carried out on whole flagellates. As the present author had the opportunity to investigate electron microscopically the very similar collar of the choanocytes of the freshwater sponge *Spongilla lacustris* (L.), using ultrathin sections (Fjerdingstad 1961), it was thought to be of interest to compare it with the structure of the choanoflagellate collar, examined by the same means.

Materials and Methods

The flagellates were obtained from a pond in the Botanical Garden of the University of Copenhagen. Jars containing about 1 liter of water from the pond were left standing for several days in the refrigerator. A film then formed on the surface, and in this some species of choanoflagellates could be found together with other microorganisms. The choanoflagellates were of the species *Codonosiga botrytis* (Ehrenb.), *Salpingoeca amphoridium* (Clark) and *Salpingoeca oblonga* (Stein). Very often they were attached to small grains of sand on the surface of the water.

* Acknowledgments. My best thanks are due to Professor H. V. Brøndsted, Ph. D. for valuable advice during the work and in the preparation of the manuscript. — Thanks are also due to Professor K. G. Wingstrand, Ph. D. for helpful discussion. — The electron microscopy was carried out at the Biophysical Institute, and I am grateful to Professor J. Koch, Ph. D. for permission to use the electron microscope. — I am much indebted to Mr. F. Carlsen, M. Sc. for his everready helpfulness. — Thanks are due to Mr. K. J. Pedersen, M. Sc. for his kind help and advice during the writing of the manuscript.

For light microscopical observations a piece of the surface film was simply placed on a slide and covered by a coverslip. Bright field, phase contrast and dark field microscopy were used for observing the living choanoflagellates.

For electron microscopy the surface film was removed from a large part of the water, placed in a centrifuge glass and concentrated by centrifuging for 5 minutes at 1500 R.P.M. It was found, that the flagellates tolerated even 3000 R.P.M. without retracting the collar and without any visible damage. After centrifuging the sediment was fixed in buffered osmium tetroxide at p_H 7.2 for $^1/_2$ hour at 2—4° C and embedded in methacrylate (1 part of methylmethacrylate to 9 parts of butylmethacrylate). Centrifuging was carried out prior to change of reagents.

Sectioning was carried out employing a Sjöstrand ultramicrotome. As many other microorganisms were present in the sediment, and the concentration of the choanoflagellates was, even at best, very low, it was found necessary to take special precautions to secure the presence of choanoflagellates at the part of the block, which was to be sectioned. The following method was used: under a dissecting microscope small layers of methacrylate were removed from the tip of the block. Each time a layer had been removed, the block was inspected under an ordinary microscope provided with a 40× water immersion objective. A total magnification of 400× had to be used in order to recognize the choanoflagellates. (The total length of the flagellates was about 15 μ, the collar being about 7 μ). The water immersion objective greatly facilitated observation of objects inside the methacrylate block, because the water partly eliminated the refraction occurring at the surface of the block. When a flagellate had been observed and the species determined the block was trimmed under the dissecting microscope, the position of the flagellate being regularly controlled under the water immersion objective until the choanoflagelate was just at the tip of the methacrylate pyramid, and then it was sectioned.

After sectioning it was observed if the flagellate had disappeared from the block. If this was the case the sections were collected on a grid coated with a carbon stabilized formvar film, stained for 2 hours in potassium permanganate after LAWN (1960), and observed in a RCA Emu 2B electron microscope.

It was necessary to take resort to this rather cumbersome and time consuming technique because of the failure to concentrate the choanoflagellates by cultivating them.

Observations

I. The appearance of the collar in the light microscope

As stated by PETERSEN and HANSEN (1954) the collar is only seen as "fine lines from the cell up each side of the flagellum" when observed with the bright field microscope. This applies for its appearance in the phase contrast microscope as well. Though the 2 faint lines will of course stand out with greater contrast, they are also here the only part of the collar visible (Fig. 1). The upper edge of the collar cannot be seen clearly, and the idea of the collar being a cytoplasmic membrane seems to be very suggestive. However, if dark field microscopy is used, the collar is seen to be composed of a great number of extremely fine fibrils, which form the collar by their circular arrangement. Already here one gets the impression that the fibrils are the only

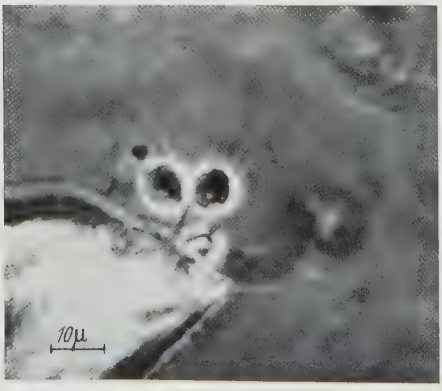


Fig. 1. Phase contrast micrograph of 2 living *Codonosigas* attached to a grain of sand by a common stalk. Only the lateral borders of the collars are visible. × 697

components of the collar; when the flagellates die after being exposed to the very strong light used in dark field microscopy, the collar fibrils will very often become disarranged. When this happens the collar loses its shape and no material can be seen between the collar fibrils. The death of the choanoflagellates will take place in about 5 minutes when they are illuminated with the full power of a 30 w microscope lamp. Therefore it proved impossible to take any photographs of them in dark field, as still stronger light would have been needed. The death of the flagellate is followed by complete lysis of the cell.

The above mentioned fibrillar structure of the collar as visualized in the dark field is seen both in *Codonosiga botrytis* and *Salpingoeca amphoridium* as well as in *Salpingoeca oblonga*. It is of interest to note that KENT (1880—1882), though as mentioned he believed that the collar was a cytoplasmic membrane, in some cases observed just the same phenomenon as the present author. His observations were also made on living choanoflagellates. In *Salpingoeca amphoridium* he sometimes saw "filamentous pseudopods" forming the collar. He wrote; "The collar may, in fact be most appropiately compared in this connection to a funnel-shaped aggregation of the single anteriorly protuded pseudopodic fascicle of some Monothalamous Foraminifer such as Lagena — —". Strange enough KENT believed this to be an "abnormal disintegration" of the collar. Still KENT must be recognized as the first who observed the real structure of the collar, though it is difficult to understand how this was possible, as he does not appear to have used dark field microscopy.

Fig. 2. *Codonosiga*, 8000×. *CF* collar fibril, *N* "nutritive vacuole", *SP* short pseudopodium, *F* flagellum, *BB* basal body, *NU* nucleus, *V* vacuoles, *G* golgi complex. The flagellate is surrounded by the envelope (*E*), which is connected with that of another cell by a bridge (*B*)

II. Electron microscopical observations on the collar

In longitudinal sections the collar fibrils are seen very clearly. They are limited by a dense line, and are 1200—2100 A wide; they seem to be widest at

the base and narrow towards the top of the collar. Sometimes small 'blebs' may be seen on them. The spacing of the fibrils is rather regular, the mutual distance being about 2500 A in the middle part of the collar. Further downwards it is smaller because the fibrils are becoming wider.

At high magnification the dense limiting line of the fibrils show the 'unit membrane' structure characteristic for cell membranes (ROBERTSON 1959) (Fig. 5). If a collar fibril is cut at the base, it is seen that it simply represents an outfolding from the surface of the cell and the cell membrane continues into the membrane

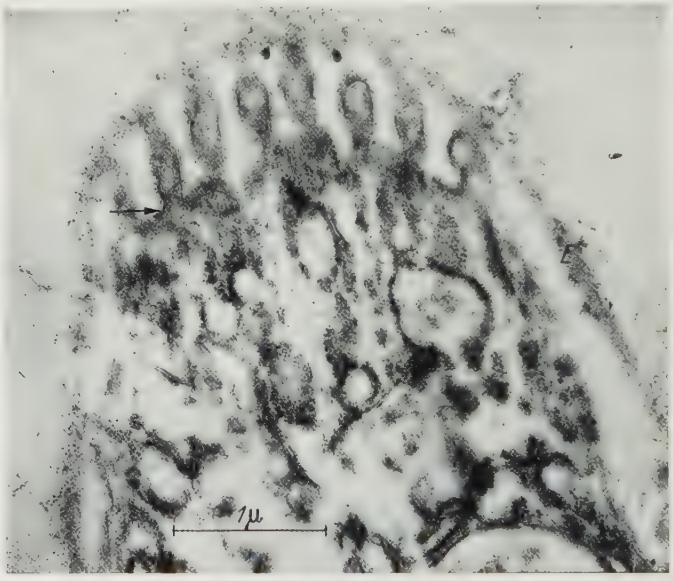


Fig. 3. Obliguely longitudinal section through the anterior part of the flagellate showing several collar fibrils. Arrow: the connection with the body of the cell. *E* envelope with surrounding mucus. × 19600

of the fibril (Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). At high magnification a number of long, faintly striated ribbons may be found at the base of the collar fibril. These ribbons are about 200 A wide, rather little electron dense and are running parallel with the cell membrane from the base of the collar fibril and some microns down into the cell. Presumably the function of these striated ribbons is to anchor the collar fibril firmly to the rest of the cell.

Obliquely longitudinal sections show, that just within the limiting membrane there is a suggestion of an outer part surrounding a light central part of the fibril.

In their whole length the collar fibrils are associated with a large amount of amorphous, irregularly distributed matter, that may stain rather strongly with potassium permanganate (Fig. 3, Fig. 4). This is probably mucus and may also be found inside the collar. The mucus seems to continue below the collar and outside the envelope which will be described later on in this paper. It thus forms the outermost layer of the flagellate.

Below the collar fibrils and outside the collar is seen another projection, which however is shorter and more irregular (Fig. 2 and 6). It runs nearly parallel to the collar fibril in its whole length (some microns) and in a lateral distance of

$^1/_2$ μ. By this method a vacuole is formed just below the collar, most probably it corresponds to the nutritive vacuole into which the food particles are taken up after being transported to the base at the outside of the collar (Lapage 1925). Just below the open nutritive vacuole another vacuole may be found, wholly inside the cytoplasm. This may be a nutritive vacuole moving downwards into the body of the cell.

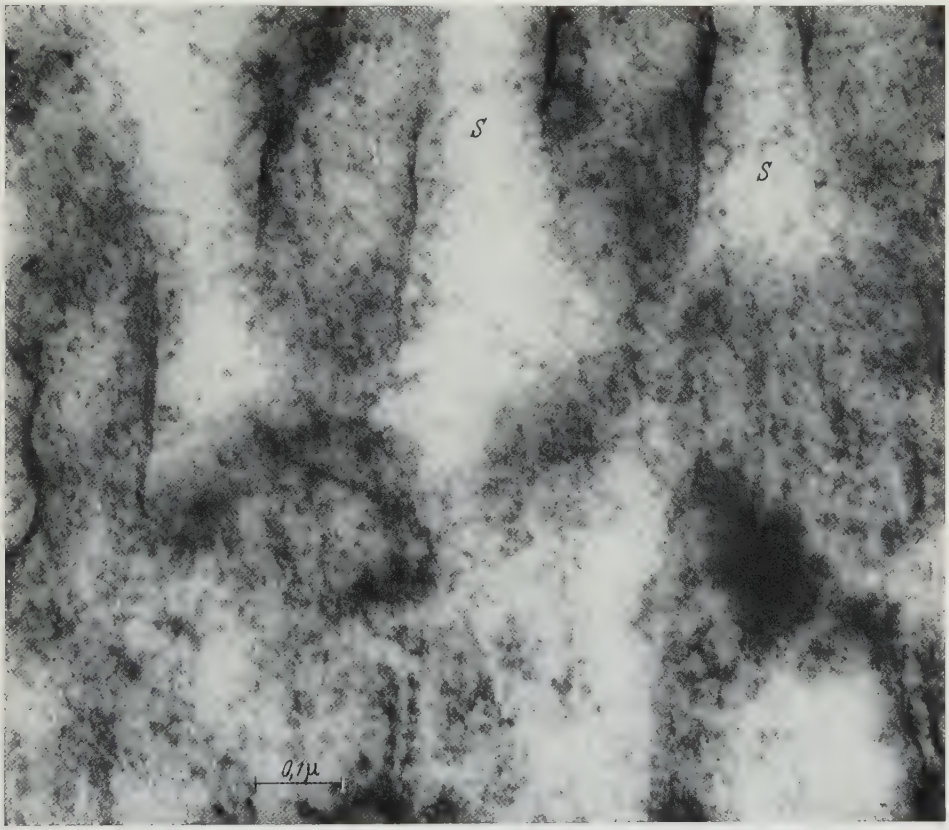


Fig. 4. The same section as Fig. 3 at high magnification, the pseudopodial nature of the collar fibrils is evident. The mucus between the fibrils has the shape of irregular strands (*S*). × 118000

Most specimens of *Codonosiga botrytis* will be found placed two by two on a common stalk branching just below the flagellates (Fig. 1). It is composed of amorphous matter containing a fibrillar component (Fig. 7). This stalk may be hollow (Petersen and Hansen 1954). From the stalk arises the envelope described by several authors (Bütschli 1878, Lapage 1925, Petersen and Hansen 1954). The envelope is composed of the same material as the stalk, its thickness decreases along its length. At the base it is 2000 A wide, and when it ends some microns up the collar it is only 680 A. Normally the collar fibrils are lying very close to this envelope. It is possible that the envelope is important as a support for the collar. About 1.5 μ from the branching point of the stalk the envelopes of two neighbouring *Codonosigas* are connected by a "bridge". This bridge is 2000 A wide and 3000 A long. The bridge explains why twin *Codonosigas*

always retain the same relative position even when moving the flagella very vigorously.

The flagellum of *Codonosiga botrytis* has some interesting features (PETERSEN and HANSEN 1954). Here only a short description of the basal part will be given.

Fig. 5. 3 collar fibrils in a longitudinal section. The shape of the fibrils is irregular. They are limited by a "unit membrane" (*U*). *M* mucus, *B* "bleb" on the fibril. × 118000

The interior shows the well-known structure. On longitudinal sections the filaments stand out very clearly (Fig. 2 and 8). The flagellum is 3800 A wide 1 μ from the base and is invested by a rather loose folded membrane showing the unit membrane structure (Fig. 8). Proximally the flagellum arises from a 1 μ long and 2000 A wide basal body having the general fibrillar structure. Around the basal body and connected with it are found a number of 200 A wide

striated ribbons, very like those found at the base of the collar fibrils (Fig. 8). Where the flagellum passes out of the body of the cell it rapidly widens from the 2000 A width of the basal body to 3800 A which is the width of the free part of the flagellum.

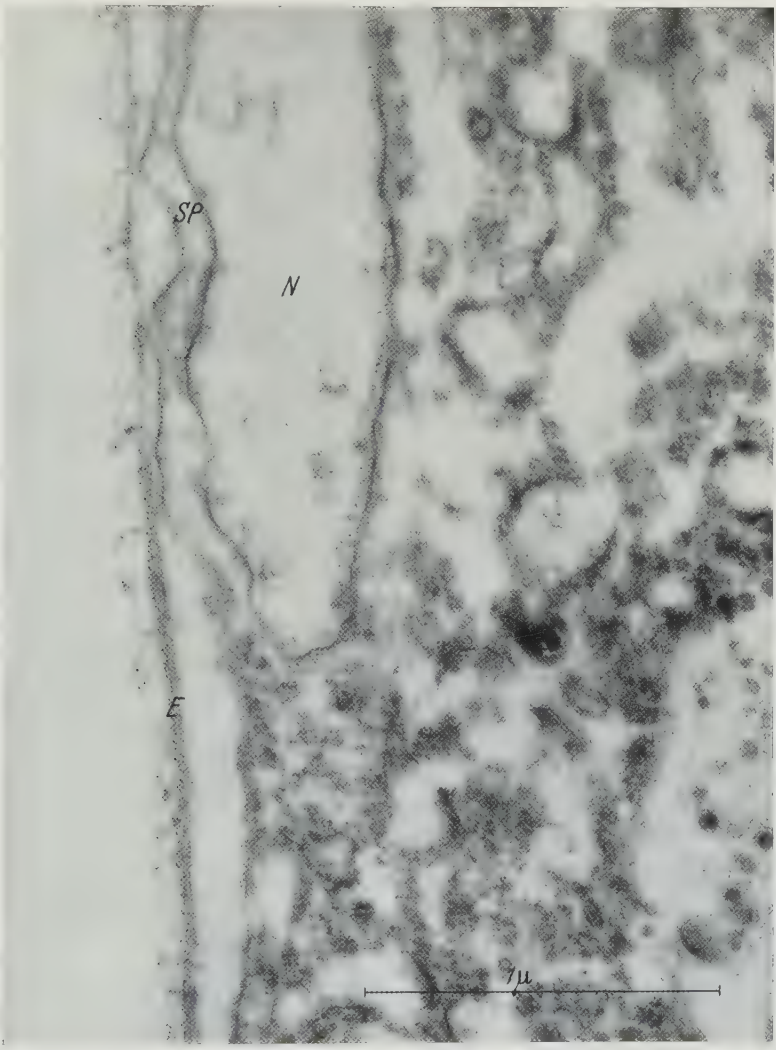


Fig. 6. Part of a longitudinal section showing the "nutritive vacuole" (*N*) and the short pseudopodium (*SP*). The envelope is seen at *E*. ×46700

The interior of the cytoplasm of *Codonosiga botrytis* will not be discussed at this occasion.

Discussion

The present investigation has for the collar of *Codonosiga botrytis* established a structure similar to that found by electron microscopy of choanocyte collars in sponges (Rasmont 1959, Fjerdingstad 1961). The "tentacles" described by

PETERSEN and HANSEN (1954) are invested by a typical cell membrane communicating directly with the membrane surrounding the choanoflagellate. Thus they may, in fact, be called pseudopodia. The pseudopodia are arranged circularly with a regular spacing, in this way forming a kind of cylindrical trellis. In contrast to the case with the choanocytes of sponges (FJERDINGSTAD 1961), the pseudopodia are not connected by microfibrils. Instead they are surrounded by a great amount

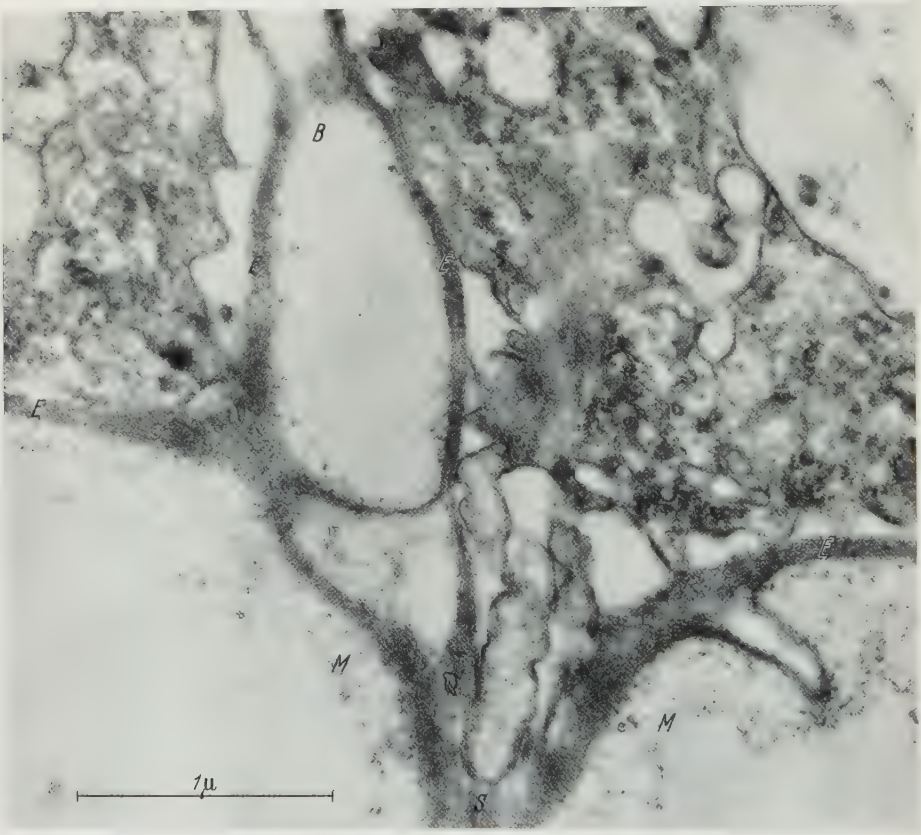


Fig. 7. Longitudinal section of the basal part of 2 *Codonosigas* and the upper part of the stalk (*S*). The envelopes (*E*) are seen to arise from the stalk. At *B* the "bridge" connecting the envelopes is seen. Mucus (*M*) surrounds the envelopes. ×34 700

of mucus. The absence of microfibrils, which in sponge choanocytes no doubt serve to reinforce the collar, may be explained by the assumption that the collar of *Codonosiga* is supported by mucus and by the envelope, which, as shown, may extend some microns up the collar, the collar lying closely up to it. The pseudopodial structure of the collar may also explain why it can by withdrawn, when the choanoflagellate is irritated, as already described by JAMES-CLARK (1868).

The function of the collar is evidently to catch the small food particles, bacteria etc., on which the choanoflagellate feeds. Most authors agree that the food particles which are carried towards the flagellate as a result of the movement of the flagellum are trapped on the outside of the collar. Thereafter they are

by some method transported down the outside of the collar and taken up by the flagellate at the base of the collar (Bütschli 1878, Ehrlich 1908, Griess-

Fig. 8. Longitudinal section of the basal part of the flagellum showing the "basal body" (*B*), and the narrowing of the flagellum where it is attached to the body of the cell (*N*). The filaments of the flagellum are seen. The central filament (*C*) is double. The flagellum is limited by a "unit membrane" (*U*). × 108000

mann 1914, Lapage 1925). The function of the flagellum in the feeding process is to create a current of water, moving away from the flagellate, new water thus streaming towards the collar from behind and from the sides of the collar. This view which is beautifully illustrated by the drawing of Lapage (1925) can be confirmed by observations with the phase contrast microscope.

The electron microscopical observations on the collar explains very well how the trapping of the food particles is effected: the flagellum by its movement transports water out of the collar, new water is sucked in between the pseudopodia, and all particles with a diameter larger than the spacing of the pseudopodia (about 2500 A) are caught on the outside of the collar. After being trapped the food particles are transported into the nutritive vacuole which has been described previously. Thus the function of the collar in *Codonosiga botrytis* would be very like that of the collar in choanocytes of *Spongilla lacustris* as described in a previous paper (FJERDINGSTAD 1961).

This view of the feeding process is rather different from that maintained by KENT (1880—1882) and the very similar view described by LACKEY (1959) for *Protospongia*. In their opinion the food is engulfed inside the collar. According to LACKEY this takes place by "a rapid shortening or folding over of the collar area so that the bacterium was virtually pushed down to the neck region and into the protoplasm there". This is certainly not the case in *Codonosiga* and *Salpingoeca*, as can easily be ascertained with the phase microscope. As the collar of *Protospongia* has the same appearance as that of other choanoflagellates, it is rather unlikely that it should behave very differently from the collars of as well other choanoflagellates as sponges. Although the matter has not been investigated it does not seem probable that it should have a different ultrastructure.

The great, morphological similarity of the choanoflagellates with the choanocytes of sponges, which as demonstrated in the case of the collar proceeds down to the ultrastructural level, has been the subject of much discussion of the relationship between sponges and choanoflagellates. Some authors have for this reason maintained that a close relationship exists (JAMES-CLARK 1868, KENT 1880—1882). Others have attached less importance to this similarity, either considering the sponges to be a separate group neither belonging to Protozoa or Metazoa (HYMAN 1940), or classifying them at the bottom of the Metazoa (DUBOSCQ and TUZET 1937, RASMONT 1959). DUBOSCQ and TUZET even denied the existence of the colonial choanoflagellate *Protospongia*, which KENT (1880—1882) believed to be a form intermediate between choanoflagellates and sponges.

Without participating in this phylogenetic discussion the present author would however like to point out a difference between sponge choanocytes and choanoflagellates, which appears to have been overlooked by some authors: the choanocytes cannot retain their choanoflagellate-like shape when separated from the other cells of the sponge. If the cells of a sponge are dissociated by squeezing it through cloth, they will become morphologically dedifferentiated (BRØNDSTED 1936). The choanocytes lose their collars and flagella and become amoeboid, but may still be recognized by their characteristic granulated nucleus. Only when a large restitution body has been formed will the choanocytes begin forming flagellate chambers, and first when a lumen is formed they will acquire collars and flagella again. From these observations, which the present author also has had opportunity to do, it seems that the choanoflagellate-like appearance of the choanocyte is not a quality of the choanocyte alone, but the result of a reversible differentiation which only takes place under the influence of the other cells in the complete sponge. Accordingly the choanocytes cannot be considered as a sort colonial choanoflagellates; they cannot exist alone in the way of choano-

flagellates. As mentioned, not all authors seem to have recognized this fact, thus Fott (1959) writes, ". . . es ist nicht ausgeschlossen, daß freie Choanocyten fälschlich als Craspedomonaden beschrieben wurden".

Accordingly it also appears that Duboscq and Tuzet (1937) are mistaken when they believe that the genus *Protospongia* of Kent (1880—1882) is only a fragment of a sponge, swimming freely with the choanocytes on the outside. In such a fragment (about 100 microns wide) the choanocytes would not be found on the outside, they would be dedifferentiated, and the fragment would soon take on the shape of a restitution body. In this the choanocytes would be found inside. It therefore seems that Lackey (1959) is right in considering *Protospongia* a valid genus. In the opinion of the present author, his pictures of this choanoflagellate does not show any resemblance to a fragment of a sponge.

In conclusion it may be stated that apparently the collar consisting of long filamentous pseudopodia surrounding a flagellum is a very effective filtering organelle. How its occurrence both in Craspedomonads and sponges can be accounted for, is difficult to decide on, it may be a case of only analogy, the sponges might have acquired this quality independently, as an adaptation to a filtering life.

Summary

The ultrastructure of the "collar "of *Codonosiga botrytis* (Ehrenb.) has been investigated using ultrathin sections and it has been compared with the morphology of the collar in the dark field microscope.

Previous observations by other authors showing that the collar consists of number of long submicroscopic projections from the cell has been confirmed. By dark field microscopy this was found also to be the case with the living flagellates.

It is shown that the projections are really pseudopodia, because they are limited by a "unit membrane", which is identical with the cell membrane surrounding the remaining part of the cell. At the base of the collar a vacuole is found, probably serving as a nutritive vacuole. This vacuole is found between the base of a collar pseudopodium and the base of a similar but shorter pseudopodium.

The structure of the envelope surrounding the flagellate is discussed. It seems that it may have some importance for reinforcing the collar. A short account is also given of the structure of the basal part of the flagellum.

The function of the collar is discussed and it is demonstrated, that it works as a filtering organelle, as is the case with the collar of sponge choanocytes.

The similarity and differences between choanoflagellates and choanocytes of sponges are discussed.

Literature

Brøndsted, H. V.: Entwicklungsphysiologische Studien über Spongilla lacustris (L.). Acta zool. (Stockh.) **17**, 75—172 (1936).

Bütschli, O.: Beiträge zur Kenntnis der Flagellaten und einiger verwandten Organismen. Z. wiss. Zool. **30**, 205—281 (1878).

Doflein, F., u. E. Reichenow: Lehrbuch der Protozoenkunde. I—II. Jena 1953. 1213 S.

Duboscq, O., et O. Tuzet: L'ovogénèse, la fécondation et les premiers stades du développement des éponges calcaires. Arch. Zool. exp. gén. **79**, 157—316 (1937).

Ehrlich, R.: Ein Beitrag zur Frage von der Membran der Choanoflagellaten. Biol. Zbl. **28**, 117—120 (1908).

Fjerdingstad, E. J.: The ultrastructure of choanocyte collars in Spongilla lacustris (L.). Z. Zellforsch. **53**, 645—657 (1961).

Fott, B.: Algenkunde. Jena 1959. 482 S.

Griessmann, K.: Über marine Flagellaten. Arch. Protistenk. **32**, 1—78 (1914).

Hall, R.: Protozoology. New York 1953. 682 p.

Hyman, L. H.: The invertebrates: Protozoa through Ctenophora. New York 1940. 726 p.

James-Clark, J.: On the spongiae ciliatae as infusoria flagellata. Ann. Mag. Nat. Hist. 14, II 133—142, III 188—215, IV 250—264 (1868).

Kent, W. S.: Manual of the infusoria. London 1880—1882.

Lackey, J. B.: Morphology and biology of a new species of Protospongia. Trans. Amer. micr. Soc. **78** (2), 202—206 (1959).

Lapage, G.: Notes on the choanoflagellate, Codosiga botrytis Ehrbg. Quart. J. micr. Sci., N. s. **69**, 275, 471—508 (1925).

Lawn, A. M.: The use of potassium permanganate as an electron dense stain for sections of tissue embedded in epoxy resin. J. biophys. biochem. Cytol. **7**, 9, 197 (1960).

Petersen, J. B.: Beiträge zur Kenntnis der Flagellatengeißeln. Bot. Tidsskr. **40**, 373—389 (1929).

—, and J. B. Hansen: Electron microscope observations on Codonosiga botrytis (Ehr.) James-Clark. Bot. Tidsskr. **51**, 281—291 (1954).

Rasmont, R.: L'ultrastructure des choanocytes d'éponges. Ann. Sci. Nat. Zool., 12^{e} ser. **1**, 253—263 (1959).

Robertson, J. D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivatives. Biochem. Soc. Symp. **16**, 3 (1959).

Schouteden, H.: Notes sur quelques amibes et choanoflagellates. Arch. Protistenk. **5**, 322—338 (1905).

Ejnar Jules Fjerdingstad,
Institute of General Zoology, University of Copenhagen,
Universitetsparken 3, Copenhagen, Denmark

Zeitschrift für Zellforschung 54, 511—529 (1961)

Aus dem Physiologischen Institut der Freien Universität Berlin
(Direktor: Prof. Dr. Dr. med. vet. h. c. M. H. Fischer)

ÜBER DIE DEGENERATION DER LEUKOZYTEN IN VITRO

(UNTERSUCHUNGEN MIT DEM PHASENKONTRASTMIKROSKOP)

Von

H.-J. Engel u. E. Zerbst

Mit 4 Textabbildungen in 23 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 15. Februar 1961)

Einleitung

Die Phasenkontrastmikroskopie hat sich besonders bei Untersuchungen in vitro überlebender Zellen gut bewährt. So haben Henderson (1928), Albrecht (1954), Kosenow (1956), Bierling (1960), Engel (1960) u. a. den Einfluß verschiedener Substanzen auf die Gestalt und die Lebensäußerungen von Einzelzellen untersucht. Für derartige Beobachtungen sind weiße Blutzellen besonders geeignet. Ihre Strukturen und die Phagozytose sind gut zu erkennen, ihre amöboide Bewegung ist einfach zu messen. Form- und Funktionsänderungen der Leukozyten können zueinander in Beziehung gebracht werden. Die Funktionen anderer Zellarten sind — z. B. in Gewebekulturen — schlechter zu erfassen. Atmung und Stoffwechsel lassen sich zwar messen, eine gleichzeitige morphologische Beobachtung ist jedoch schwierig. Bei experimentellen Untersuchungen an Einzelzellen müssen aber alle morphologischen und funktionellen Veränderungen bekannt sein, die in vitro auftreten. Sie können sonst mißdeutet und eventuell als Reaktion auf zugesetzte Substanzen verstanden werden.

Das normale Bild der Leukozyten und ihr Verhalten ist bisher nur aus kurzzeitigen Beobachtungen bekannt. Die Veränderungen dieser Zellen während der Alterung sind noch nicht systematisch untersucht worden. Ein großer Teil der Arbeiten basiert auf färberischen Untersuchungen. Bei phasenkontrastmikroskopischen Beobachtungen sind auch nur Ausschnitte aus dem Degenerationsverlauf der Leukozyten gegeben worden. Es kam deshalb bei der Beurteilung von Zellen in gealtertem Blut, Speichel, Liquor, Harn, Galle und Exsudaten häufig zu Verwechselungen einzelner Leukozytenarten.

Um eine Grundlage für experimentelle Untersuchungen und für die Differenzierung in vitro zu geben, haben wir den Verlauf der *Degeneration einzelner Leukozyten fortlaufend bis zum Zelltod systematisch* untersucht.

Bisherige Befunde

Das Bild der im *Gewebe* bei Entzündungen, Nekrose oder Infarkt absterbenden Leukozyten ist von Weigert (1877), Hindenburg (1894), Fraenkel und Troje (1895) beschrieben worden. Leukozytäre Abbauformen in *Blutausstrichen* haben Undritz (1941), Heilmeyer und v. Mutius (1946), Lübbers und Koch (1950) beobachtet. Koch (1950) hat gezeigt, daß das Auszählen der Abbauformen im peripheren Blut wichtige diagnostische Rückschlüsse ermöglicht. Leukozyten als *phagozytierte Einschlüsse* in Histiozyten haben Kaznelson (1918) und Schilling (1919) bei Pyämien und Endokarditis gesehen. Phagozytierte Kernreste neutrophiler Granulozyten in Leukozyten und deren differentialdiagnostische Bedeutung

bei Erythematodes hat Hargraves (1954) beschrieben. Leukozytäre Abbauformen in *Zitratblut* sind von Koeffler (1950) und Parrisius und Schlopsnies (1927) untersucht worden. Über Veränderungen der Leukozyten in *Blutkonserven* haben unter anderen Thomas (1953) und Schneider (1953) berichtet, über Veränderungen der Leukozyten im *Liquor* cerebrospinalis Haupt (1954). Simpson (1943) hat die Veränderungen dieser Zellen in Exsudaten untersucht. Die sog. *Speichelkörperchen* (Schumacher 1927) sind von Gaulhofer (1956) als Granulozyten-Abbauformen erkannt worden. Über den klinisch-diagnostischen Wert der Zelluntersuchung im Zungenabstrich äußert sich Stein (1955), über Veränderungen der Leukozyten im *Harnsediment* und deren diagnostische Bedeutung Nieth und Dippel (1958). Schließlich sind leukozytäre Abbauformen in *Knochenmarkkulturen* nach Zusatz von Immunseren von Ballowitz (1954) beschrieben worden.

Die erwähnten Untersuchungen sind meist an gefärbten Präparaten durchgeführt worden. Da die Fixierung und Färbung normale Zellstrukturen schon erheblich verändern, haben solche Methoden bei Untersuchungen über den Abbauverlauf an Leukozyten nur wenig Wert. So hat Schilling (1919) bei Endokarditis in Monozyten phagozytierte Myelozyten und Normozyten beschrieben. Koch und Lübbers (1949) erkannten diese Zellen als granulozytäre Abbauformen, die zu bestimmten Zeiten rundkernigen Stammzellen ähnlich sehen können. Bessis (1956), Kosenow (1956) u. a. haben überlebende Zellen in vitro nur über kurze Zeiträume beobachtet. Ihre Untersuchungen geben deshalb nur Teilausschnitte aus dem gesamten Abbaugeschehen wieder.

Methodik

Deckglaspräparate von menschlichem Blut (Fingerbeere) wurden phasenkontrastmikroskopisch bei Zimmertemperatur untersucht. Es wurden nur neue Objektträger und Deckgläser verwendet, die nach der üblichen Methode sorgfältig gereinigt waren. Auf mehrmals benutzten Objektträgern breitet sich das Blut ungleichmäßig aus; die Beobachtung der Leukozyten wird dadurch erheblich erschwert. Alle Kanten des Deckglases werden dann mit Paraffin abgedeckt. Wir haben den Abbau ein und desselben neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten fortlaufend bis zum Zelltod beobachtet. Es wurden dabei viele Zellen derselben Art vergleichsweise untersucht. Wegen ihres seltenen Vorkommens sind die basophilen Granulozyten nicht berücksichtigt worden.

Optische und photographische Daten. Mikroskop: Zeiss-W-Stativ mit Objekt Apo 100/1,32 Ph und Photo-Okular 6×. Kamera: Contax IIa. Film: Agfa Isopan FF 13° Din. Beleuchtung: Zeiss-Hochleistungs-Mikroskopierleuchte mit Niedervoltglühlampe 12 V, 100 W. Filter: Interferenz-Bandfilter grün. Belichtungszeit: $^1/_2$ sec. Vergrößerung auf allen Abbildungen 1350:1[1].

Befunde

Über das normale Bild lebender Leukozyten im Phasenkontrastmikroskop haben Franke (1954), Hansen und Rominger (1955), Bessis (1956), Kosenow (1956) u. a. ausführlich berichtet. Wir beschränken uns deshalb auf die Beschreibung der normalen intakten Zellorganellen, die im Laufe der Degeneration typischen Veränderungen unterliegen.

Unmittelbar nach der Präparatherstellung sind die meisten Zellen noch abgerundet. Später sammeln sich in den neutrophilen Granulozyten die Granula in bestimmten Bezirken dicht an; kurz danach werden hier Pseudopodien gebildet. Die Granula strömen dann plötzlich — wie nach Überwinden einer Schranke — in die Ausläufer hinein, in denen sie sich mit relativ großer Amplitude bewegen. Die ersten Pseudopodien sind zungenförmig und glattrandig. Während

[1] Für die Herstellung der mikrophotographischen Aufnahmen danken wir Fräulein Regina Schütz.

der Migration nehmen die Zellen Glocken- oder Handspiegelform an. Bei den eosinophilen Granulozyten und Monozyten sind die Vorgänge ähnlich. Die Lymphozyten bilden bei der Wanderung nur hyaline Fortsätze; die oben geschilderten Granulaverschiebungen treten bei ihnen nicht auf.

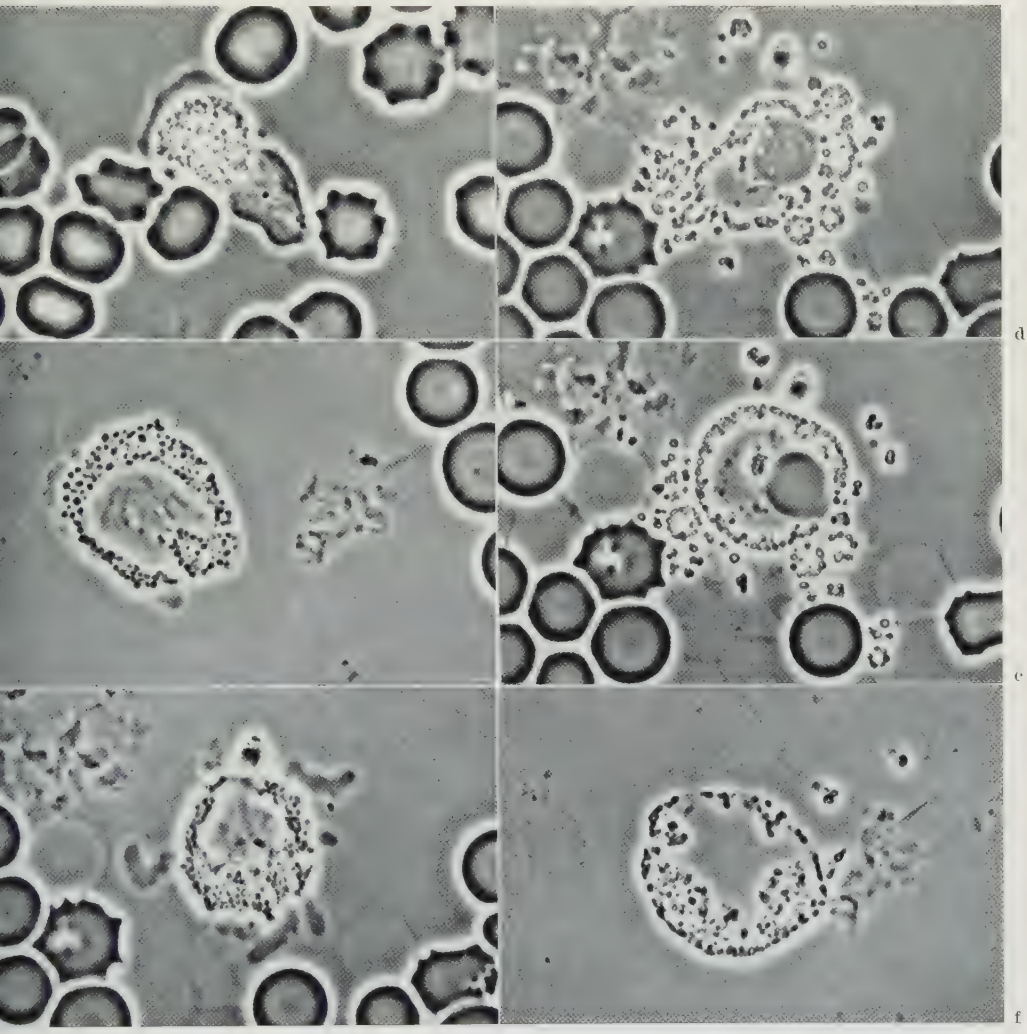


Abb. 1a–f. Abbau eines eosinophilen Granulozyten. a Normale Zelle; b reversible Pseudopodienbildung und Vakuolen; c irreversible Pseudopodienbildung und Vakuolen; d Abschnürungen der Pseudopodien, beginnende Kernautolyse nach Zusammenfließen der Segmente; e Anschwellen des Zellrestes und autolytischer Kern; f Zellrest weiter geschwollen, deformierter Kern in Auflösung

Die Granula sind in allen lebenden Leukozyten in Bewegung, am stärksten in den Granulozyten. Da die Körnchen in den Monozyten viel kleiner sind, ist ihre Bewegung schlechter zu erkennen. In den Lymphozyten sieht man erst nach längerer Beobachtung eine langsame Bewegung der Granula.

Alle Zellen haben ein deutlich sichtbares Cytozentrum. In den Lymphozyten und Monozyten ist es durch sternförmige Anordnung der Granula an den

Kerneinbuchtungen markiert. Bei den segmentkernigen Granulozyten ist dieser Bezirk als granulafreie Stelle zwischen den Segmenten deutlich zu erkennen. Bei längerer Beobachtung sieht man einzelne Granula aus der Peripherie fast gradlinig und schnell auf dieses Zentrum zuwandern. In dessen Nähe angekommen,

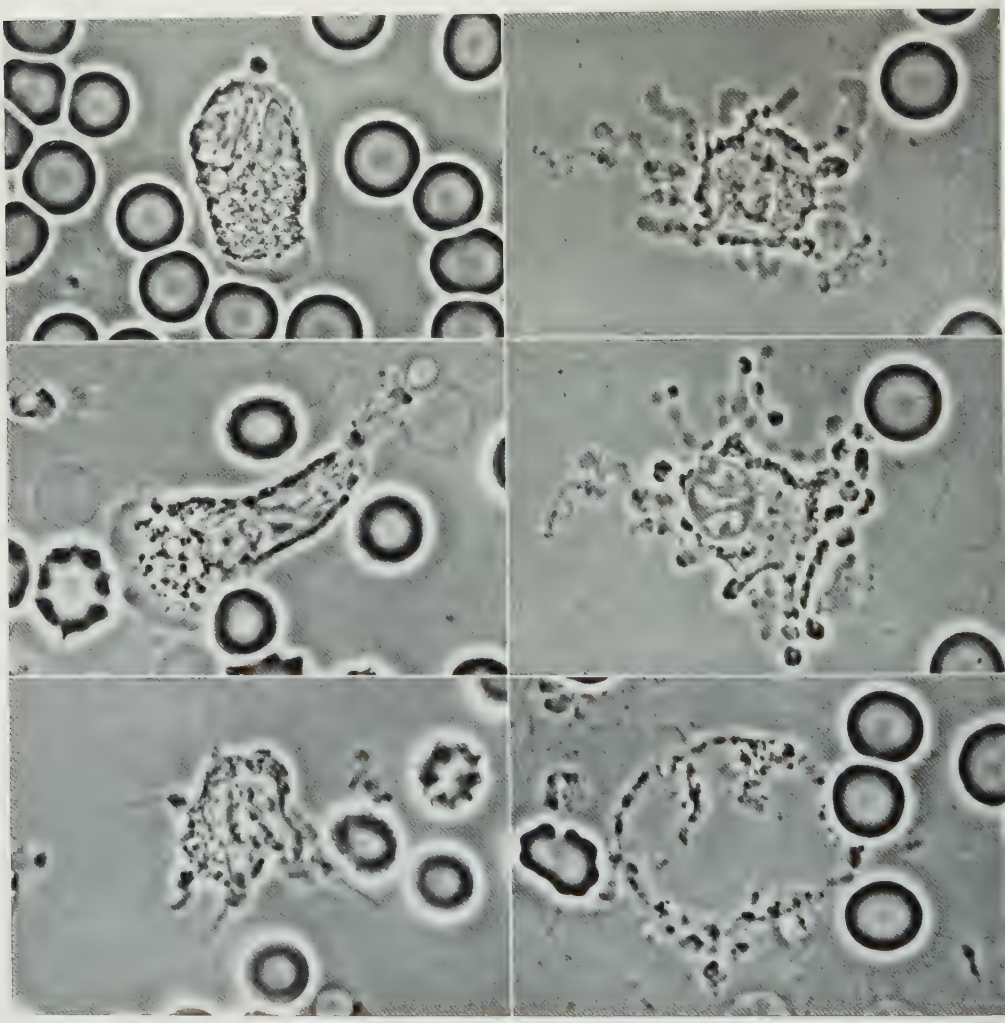


Abb. 2a—f. Abbau eines neutrophilen Granulozyten. a Normale Zelle; b Kernwandverdichtung, grobe Granula, Vakuolen; c reversible Pseudopodienbildung, weitere Kernwandverdichtung und Verklumpen der Kerninnenstrukturen; d irreversible Pseudopodienbildung; e Abschnürungen der Pseudopodien, zusammengeflossene Kernsegmente und beginnende Kernautolyse; f ballonartig angeschwollener Zellrest, Kern aufgelöst

werden sie ein kurzes Stück zurückgeschleudert, um dann wieder langsam zur Peripherie zu wandern. In Lymphozyten ist dieser Vorgang wegen der langsamen Granulabewegung nur schwer zu erkennen. Wie wir zeigen konnten, ist aber die Bewegung auf das Cytozentrum hin auch in den Lymphozyten mit Zeitrafferaufnahmen durch den Film deutlich zu machen.

Nach 1—2 Std findet man an vielen neutrophilen Granulozyten neben den beschriebenen Pseudopodien rundliche, granulahaltige Anhängsel, die Endkörperchen. Auch Lymphozyten besitzen häufig Endkörperchen, die vereinzelt Granula enthalten. Eosinophile Granulozyten und Monozyten sind meist frei von Plasma-

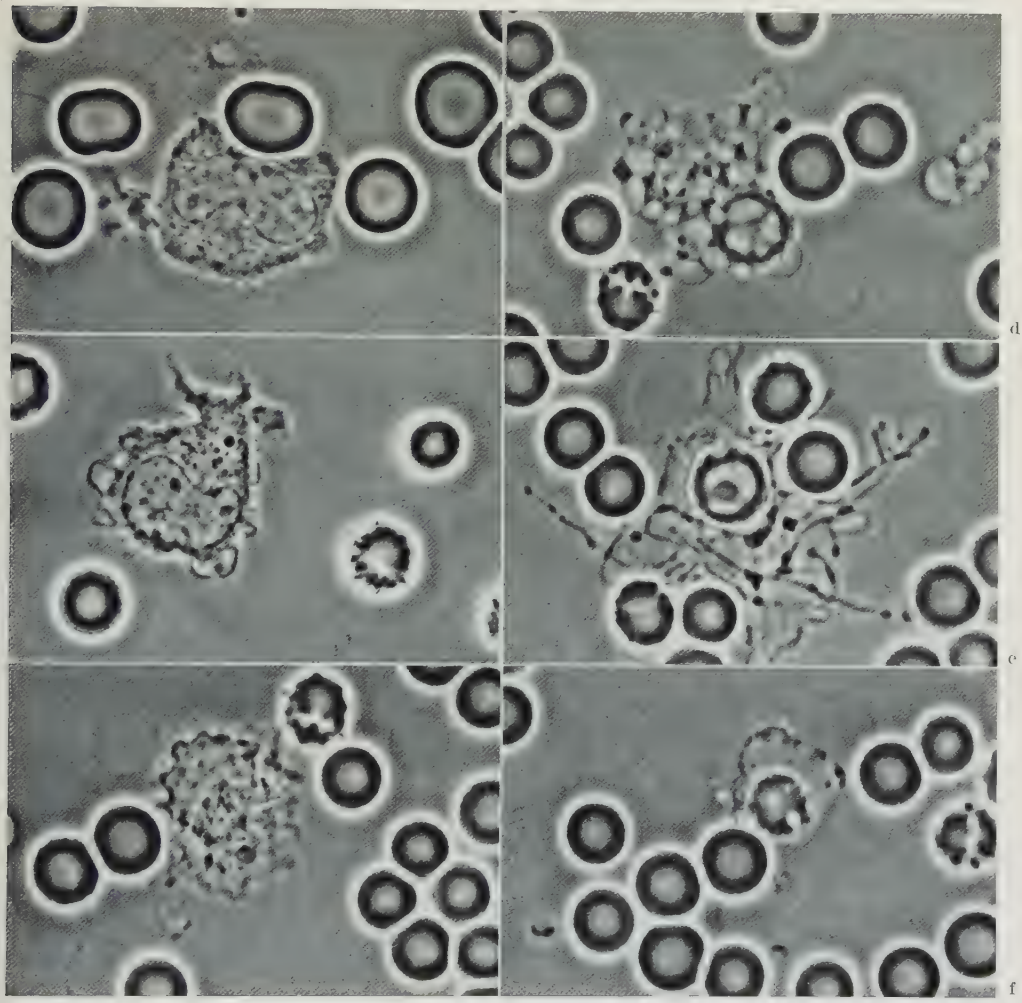


Abb. 3a—f. Abbau eines Monozyten. a Normale Zelle; b Kernwandverdichtung, grobe Granula, Vakuolen, Pinozytose; c Beginn der irreversiblen Pseudopodienbildung, weitere Verdichtung der Wand des deformierten Kerns; d wabenartiges Aufschwellen des Plasmas, Verkugelung und Verkleinerung des Kerns mit zunehmender Kernwandverdichtung bei Zellvergrößerung; e Auslaufen und Abschnüren der Plasmafäden, beginnende Kernautolyse; f Zell- und Kernrest

anhängseln. Die Kerne aller Zellarten haben in frisch hergestellten Präparaten eine gut sichtbare Innenstruktur. Die Monozyten- und Lymphozytenkerne sind derart transparent, daß auch feinere Strukturen zu erkennen sind. In den neutrophilen Granulozyten sind die dichten Kernränder besonders auffällig.

Das *erste Degenerationszeichen* zeichnet sich durch *Kernveränderungen* (Kernwandverdichtung) und Bildung grober Granula aus. Es kommt in allen Zellen

zur Verdichtung der Chromatinmassen in der Peripherie des Kerns bzw. der -segmente. Bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten tritt die Kernwandverdichtung schon nach 2 –3 Std auf, bei den Lymphozyten nach 10 Std und bei den Monozyten erst nach etwa 12 Std. Auch die Entwicklung der groben Granula läßt sich zeitlich und quantitativ verfolgen. Sie bilden sich besonders stark

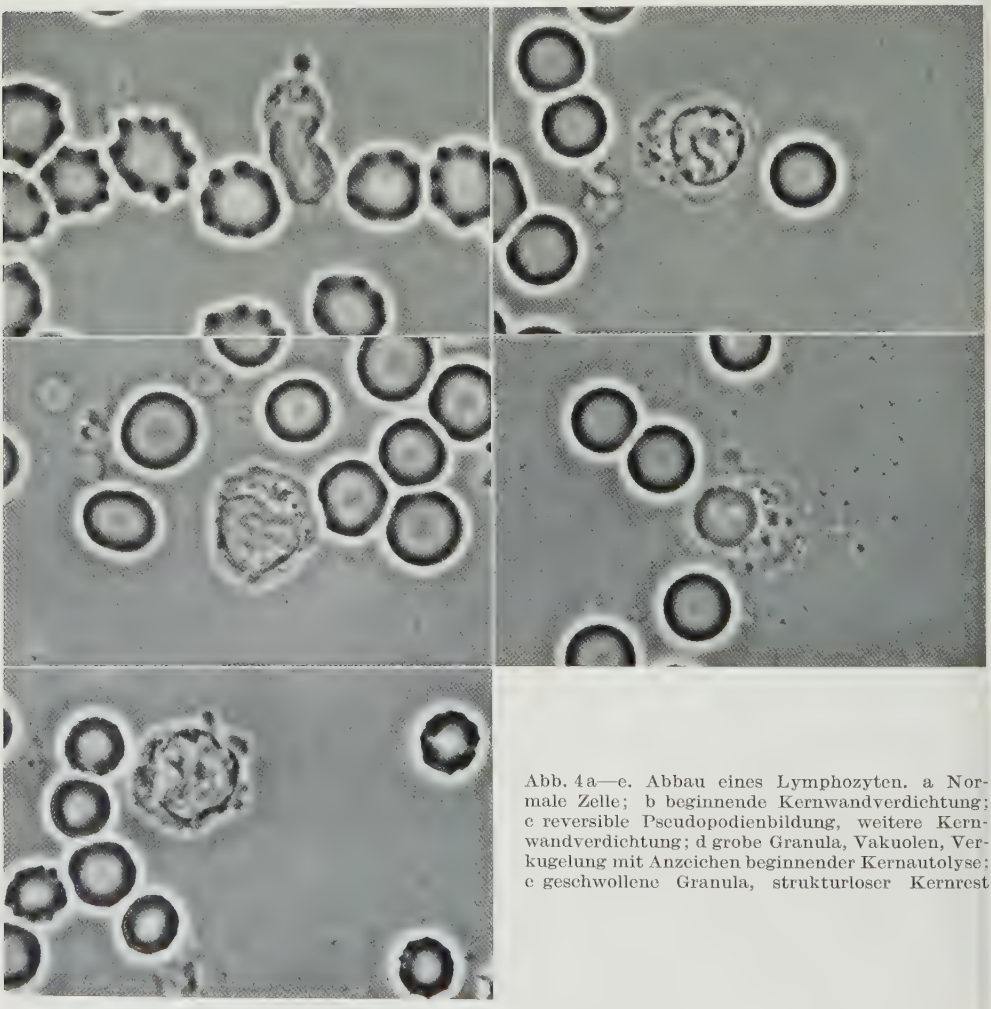


Abb. 4a—e. Abbau eines Lymphozyten. a Normale Zelle; b beginnende Kernwandverdichtung; c reversible Pseudopodienbildung, weitere Kernwandverdichtung; d grobe Granula, Vakuolen, Verkugelung mit Anzeichen beginnender Kernautolyse; e geschwollene Granula, strukturloser Kernrest

zwischen der 3. und 5. Std; vor allem in den neutrophilen Granulozyten. Die Monozyten folgen mit gleicher Tendenz. In den eosinophilen Granulozyten werden sie zum Teil von den großen spezifischen Granula verdeckt und sind deshalb nicht zu zählen. Die Lymphozyten haben zu dieser Zeit noch keine groben Granula.

Während dieses ersten Degenerationsstadiums kommt es in vielen Zellen zur *Vakuolenbildung*. Wir haben die Vakuolen, die in den Leukozyten einer Versuchsperson innerhalb 7 Std auftraten, ausgezählt. Die eosinophilen Granulozyten

konnten auch hier nicht berücksichtigt werden, weil kleinere Vakuolen durch die doppelbrechenden spezifischen Granula überstrahlt werden. In den Monozyten sind Vakuolen schon etwa 1 Std nach Präparatherstellung sichtbar, in den neutrophilen Granulozyten nach 2—4 Std. Erst nach etwa 50 Std sieht man auch in Lymphozyten Vakuolen. Sie haben keine sichtbar nachteilige Wirkung; weder auf die Art der Migration, noch auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Leukozyten.

Während zu Beginn des ersten Degenerationsstadiums nur einzelne Pseudopodien vorhanden sind, und man am Ort ihres Auftretens die Wanderungsrichtung der Zelle ablesen kann, treten im weiteren Verlauf immer häufiger *mehrere* und *unregelmäßige Ausläufer* an verschiedenen Stellen der Zelle gleichzeitig auf, wodurch die Wanderungsrichtung oft geändert wird. Die Ausläufer der neutrophilen Granulozyten, die anfangs zungenförmig und glatt waren, nehmen jetzt spitze Formen an; sie sind optisch unterschiedlich dicht. Auch die Fortsätze der Monozyten werden bizarrer. Nur die eosinophilen Granulozyten haben noch ihre abgerundeten und plumpen Pseudopodien.

Das anfänglich deutlich sichtbare *Cytozentrum* ist in den neutrophilen Granulozyten nur noch schwer zu erkennen. Auch die strahlenförmige Anordnung der Granula in den Monozyten und Lymphozyten ist nicht mehr deutlich. In den eosinophilen Granulozyten ist es noch gut sichtbar.

Im *zweiten Degenerationsstadium* werden *regellose, multiple Pseudopodien* gebildet. Sie treten gleichzeitig auf und verhindern so zeitweilig die amöboide Bewegung der Zelle. Ganz plötzlich werden sie dann wieder eingezogen und die Zelle wandert normal weiter, bis sich der geschilderte Vorgang wiederholt. Die zeitlichen Abstände zwischen normaler und regelloser Pseudopodienbildung werden dabei von Mal zu Mal kürzer. Die stärkste Ausprägung dieses noch reversiblen Geschehens findet man bei den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Es tritt erstmalig nach etwa 24 Std bei ihnen auf. Bei den Monozyten sieht man es nach etwa 30 Std.

Kennzeichnend für das *dritte Degenerationsstadium* sind die *irreversiblen, multiplen Cytoplasmaausläufer*. Diese verlängern sich zu tentakelartigen Gebilden, wobei es zu tiefen, oft bis an den Kern reichende Einschnürungen des Cytoplasmas kommt. In die Ausläufer fließen dann Granula aus dem übrigen Zellareal. Die eosinophilen Granulozyten haben plumpe, fast keulenartige Ausläufer, die kürzer sind als die der neutrophilen Granulozyten. Nach einer Zellkonvulsion erfolgt bei den Monozyten ein wabenartiges Aufschwellen des gesamten Cytoplasmas. Aus diesen Waben laufen dann dünne Fäden aus, die später etwas Granula enthalten. Neben diesen dünnen Cytoplasmafäden findet man oft blasenartige Gebilde, die sich wegen ihrer strichartigen, feinen Umrisse nur schlecht von der Umgebung abheben und deshalb leicht übersehen werden können. Im Gegensatz zu den frei flottierenden fädigen Ausläufern bewegen sich die Blasen nicht. Den Lymphozyten fehlen die für die anderen Zellen charakteristischen Tentakel. Sie bilden nur manchmal, etwa um die 50. Std, kleine tropfenartige Ausläufer.

Gleichzeitig mit der Tentakelbildung kommt es zu weiteren Kernveränderungen. Die Kernwände verdichten sich stark, die Innenstrukturen verschwinden und das Innere des Kerns bzw. der -segmente hellt sich mehr und mehr auf, so daß

die Kerne oft ringförmig erscheinen. Das Chromatin schiebt sich dann weiter von der Peripherie zur Mitte vor und füllt schließlich den Kern gleichmäßig aus. Während dieser Kernumwandlungen, die sich in 4—5 Std vollziehen, können auch Kernsegmente zusammenfließen. Zum Teil noch während der Kernumwandlung lösen sich die irreversiblen Pseudopodien langsam ab. Bei den Monozyten bleibt nur eine kleine Cytoplasmamenge zurück, so daß sie in diesem Stadium mit ihrem relativ großen, runden und dunklen Kern großen Lymphozyten ähneln können. Bei Lymphozyten haben wir Cytoplasmaabschnürungen nicht gesehen.

Im *letzten Stadium* hört die Pendelbewegung der Granula auf. Der Zellrest schwillt langsam und rundet sich ab. Eine Ausnahme bilden die Monozyten, ihr Zellrest verändert sich nicht weiter. Alle Leukozyten sind in diesem Stadium nahezu strukturlos; sie sehen ausgelaugt aus. Die Kerne sind als helle, optisch leere, runde Höfe zu erkennen. Die Granula liegen in der Peripherie der Zelle. Dieses Endstadium ist bei den neutrophilen Granulozyten nach etwa 50 Std erreicht, bei den eosinophilen Granulozyten nach ungefähr 60 Std und bei den Monozyten nach etwa 100 Std. Erst nach etwa 150 Std sind auch die Lymphozyten so weit degeneriert.

Überblickt man die Abbaustadien aller Leukozyten, so ergibt sich eine prinzipielle Übereinstimmung im Abbauverlauf aller Zellen: Kernwandverdichtung, Bildung grober Granula, Vakuolenbildung, Aussenden reversibler Pseudopodien, Umwandlung in irreversible Pseudopodien, Kernautolyse, Anschwellen des Zellrestes.

In frisch hergestellten Präparaten verhalten sich die Zellen über einige Zeit normal. Das *erste Degenerationsstadium* beginnt, wenn sich grobe Granula bilden und die Kernwandverdichtung einsetzt. Das ist bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten schon nach 2—3 Std, bei Lymphocyten nach etwa 10 Std und bei Monozyten erst nach 12 Std der Fall. Dieses Stadium dauert bei neutrophilen und eosinophilen Granulozyten sowie Monozyten etwa 20 Std. Bei den Lymphozyten ist es mit etwa 40 Std doppelt so lang.

Die Veränderungen des Cytoplasmas kennzeichnen den Beginn des *zweiten Degenerationsstadiums*. Die Zellen bilden multiple, aber noch reversible Ausläufer. Bei den Monozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten ist dieses Stadium mit etwa 3 Std relativ kurz. Bei den Lymphozyten dauert es wesentlich länger, ungefähr 30 Std.

Im *dritten Degenerationsstadium* gehen die multiplen Pseudopodien in irreversible über. Im *letzten Stadium* verändern sich nur noch die Kerne autolytisch. Diese Vorgänge dauern bei neutrophilen Granulozyten etwa 20 Std, bei eosinophilen Granulozyten 30 Std, bei Monozyten und Lymphozyten etwa 70 Std.

Vergleicht man die Degenerationszeiten der einzelnen Zellarten, dann fällt auf, daß die *Lymphozyten die längste Überlebensdauer* haben. Nach Kline (1952), Esselier (1952), Ottesen (1954) und Resegotti (1957) überleben die Lymphozyten auch in vivo am längsten.

Um eine bessere Übersicht zu bekommen, haben wir den Verlauf der Leukozytendegeneration in verschiedene Stadien eingeteilt, die Übergänge zwischen diesen Stadien sind fließend. Zeitliche und morphologische Abweichungen treten

besonders bei solchen Zellen auf, die in einem sehr engen Kapillarspalt des Präparats liegen und deshalb ungewöhnlich flach ausgebreitet sind. Diese Zellen sind meist schon mechanisch geschädigt, was sich aber erst im Laufe der Zeit bemerkbar macht.

Diskussion

Da wir unsere Untersuchungen in Deckglaspräparaten durchgeführt haben, müssen die Zellen nach einer bestimmten Zeit absterben. Wir haben berechnet, wie lange der Stoffwechsel der Leukozyten mit den unter unseren Bedingungen vorhandenen Sauerstoff- und Glykogenmengen „theoretisch" aufrechterhalten werden kann.

In unserer Kammer, die etwa 3 mm^3 Blut enthält ($21 \times 26 \times 0{,}006$ mm), finden sich neben 15 Mill. Erythrozyten 21000 Leukozyten. 15 Mill. Erythrozyten enthalten 0,0065 ml Sauerstoff, mit denen 21000 Leukozyten rund 8 Tage auskommen müßten, wenn man die Partialdruckabnahme des Sauerstoffs und die Zunahme der Kohlensäure vernachlässigt. Nach unseren Beobachtungen sterben die Granulozyten aber schon nach etwa $1^1/_2$ Tagen. Sauerstoffmangel kann die Ursache ihres Unterganges nicht sein. Warburg (1958) hat nachgewiesen, daß Zellen in Kulturen nur solange atmen, wie sie frei suspendiert sind. Bringt man z. B. Leukozyten auf eine Unterlage, an der sie haften können — wie das in unseren Präparaten der Fall ist —, atmen sie nicht mehr. Sie haben dann einen rein glykolytischen Stoffwechsel.

Valentine (1951) gibt an, daß in 10^{10} Leukozyten 100 mg Glykogen gespeichert sind. Diesen Wert legen wir unseren Berechnungen zugrunde. Remmle (1955) stellt fest, daß die Leukozyten mit dieser Glykogenmenge den aeroben Stoffwechsel über 97 min und einen anaeroben über 137 min aufrechterhalten können. Da die Leukozyten aber auch aus der Glukose des Plasmas Glykogen aufbauen können (Willstädter und Rhodewald 1937), müßte der Stoffwechsel noch über 137 min hinaus bestehen. Wir haben errechnet, daß in 3 mm^3 Blut (Zellen und Plasma) unserer Kammer 0,00276 mg Glukose enthalten sind (in 100 ml = 93 mg). Würde diese Menge zur Neoglykogenese verbraucht werden, dann müßte eine anaerobe Glykolyse über 34 Std möglich sein.

Nach etwa 30 Std endet in unseren Untersuchungen das dritte Degenerationsstadium der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Ein Vergleich der errechneten mit den experimentell gefundenen Zeiten kann dazu verleiten, die Berechnungen experimentell bestätigt zu sehen. Bei einer Temperatur von 37° C wäre das der Fall. Da wir aber bei Zimmertemperatur untersucht haben, läuft unter diesen Bedingungen der Stoffwechsel mit verminderter Intensität ab. Demzufolge müßten die Granulozyten etwa 100 Std leben. Tatsächlich sind sie aber schon nach etwa 30 Std abgestorben. Die Glukosevorräte sind zu diesem Zeitpunkt noch nicht verbraucht. Es müssen andere Faktoren, die sich aus den Bedingungen des Deckglaspräparates ergeben, zu bestimmten Zeiten, die für die einzelnen Zellarten unterschiedlich sind, den frühen Beginn der Degeneration erzwingen. In Übereinstimmung mit anderen Autoren können wir feststellen, daß die Lymphozyten gegenüber äußeren, unphysiologischen Bedingungen viel resistenter sind als die übrigen weißen Blutzellen.

Als Kriterium der Vitalität aller weißen Blutzellen sehen wir die *amöboide Bewegung* an. Es wurden deshalb nur solche Zellen fortlaufend beobachtet, die

sich bald nach Präparatherstellung amöboid bewegten und nicht sichtbar geschädigt waren. Die Phagozytose oder die Haftfähigkeit, die anderen Autoren als Kriterium dienten, konnten unter unseren Versuchsbedingungen nicht gemessen werden. Die Phagozytose ist auch kein zuverlässiges Vitalitätszeichen, da in tote Zellen Korpuskel eindringen und eine Phagozytose vortäuschen können. Simpson (1943) sieht in der Granulabewegung das beste Zeichen der Zellvitalität; sie nimmt an, daß der Zelltod erst dann eintritt, wenn die Granulabewegung aufhört. Wir sahen aber noch Bewegungen der Granula lange nach Aufhören der Plasmabewegungen, ferner in völlig abgestorbenen Zellen. Diese Brownschen Molekularbewegungen haben aber nichts mit Lebens- oder Stoffwechselvorgängen zu tun. In der Pseudopodienaktivität sehen einige Autoren kein Vitalitätskriterium. Nach Simpson (1943) sollen Pseudopodienbewegungen auch durch Zug oder Strömung des Inkubationsmediums passiv ausgelöst werden können. Bei Untersuchungen in Durchflußkammern haben wir normale Pseudopodien durch Sog oder Strömung nie passiv bewegen können. Bei den Beobachtungen von Simpson muß es sich unseres Erachtens um das Flottieren degenerativer Ausläufer gehandelt haben.

Untersuchungen von Lettré (1951) haben gezeigt, daß spezielle kontraktile Proteine in der Zelle den Spannungszustand der Membran in Abhängigkeit vom Energiestoffwechsel bestimmen. Es genügt aber nicht, nur die Stoffwechseleinflüsse auf die Membran zu berücksichtigen; intra- und extrazellulär wirksame Kräfte ergänzen sich. Extrazellulär wirken Oberflächenkräfte, die mit ihren Differenzen an den Grenzflächen Zelle:Medium und Zelle:Unterlage den Spannungszustand der Zellmembran passiv ändern können. Man muß also die stoffwechselabhängige aktive Oberflächenspannung der Zellmembran mit der physikalisch bedingten passiven Oberflächenspannung in Wechselbeziehung sehen. Der Unterlage, d. h. der Art des Objektträgers (vgl. v. Philipsborn 1925) kommt für die amöboide Bewegung in vitro offensichtlich keine große Bedeutung zu. In letzter Zeit griffen Bessis (1956) und Kosenow (1956) diese Frage wieder auf. Sie haben auf Glas- und Quarzobjektträgern kein unterschiedliches Verhalten der Blutzellen gefunden. Auch die Behandlung der Objektträger mit Agar, Silicon oder Formvar hatte keinen Einfluß. Auf Plexiglas verhalten sich die Zellen wie auf normalen Objektträgern. Bedeutungsvoller für die Zellvitalität ist die Art des Inkubationsmediums. In isotonischen Salzlösungen wandern Blutzellen nicht. Nach Baudisch (1957) ist die Ausbreitung und Wanderung der Blutzellen nur in plasmahaltigen Lösungen möglich. Bei Kontakt mit Plasma überzieht sich die Glasoberfläche mit einem „Fibrinfilm", auf dem die Zellen haften und amöboid wandern können.

Die Wanderungsgeschwindigkeit ist von der Zellart, deren Vitalität und der Präparattemperatur abhängig. Sie ändert sich während der Degeneration. Bei neutrophilen Granulozyten nimmt sie in den ersten beiden Stunden zu. Offensichtlich passen sich die Zellen in dieser Zeit den Bedingungen in vitro an. Diese Anpassung kann auf die Stoffwechselumstellung oder auf die langsame Bildung des „Fibrinfilms" zurückgeführt werden, der eine Wanderung erst möglich macht. Nach 2 Std hat die Wanderungsgeschwindigkeit der neutrophilen Granulozyten ihren Höchstwert erreicht und fällt dann wieder ab. Im Nachlassen der amöboiden Bewegung sehen wir ein erstes Zeichen der funktionellen Degeneration der Zelle.

Es tritt gleichzeitig mit der Kernwandverdichtung und der Vermehrung der groben Granula auf. Bei den anderen Zellarten wird die maximale Wanderungsgeschwindigkeit erst etwas später erreicht. Während die Granulocyten nahezu kontinuierlich bis zum Zelltod wandern, wechseln bei den Lymphozyten Phasen der Wanderung mit längeren Ruhepausen, die bis zur 10. Std immer kürzer werden. Zu dieser Zeit findet man den maximalen Prozentsatz der Wanderungsformen. Auch die Wanderungsgeschwindigkeit hat dann ihren Höchstwert, der etwa 60 Std konstant gehalten wird. Danach fällt die Wanderungsgeschwindigkeit wieder ab. Dieses Verhalten entspricht der relativ späten morphologischen Degeneration der Lymphozyten.

Die Bewegungsrichtung wird von den Pseudopodien bestimmt. Am Ort ihres Entstehens sammelt sich ein Teil der Granula, um dann plötzlich in das Cytoplasma der Ausläufer zu fließen. Giersberg (1922) kennzeichnet diesen Vorgang als „Barrierephänomen". Er glaubt, daß die Granula, durch die größere Viskosität in den Pseudopodien, im Entoplasma zurückgehalten werden und die Barriere erst nach Viskositätsminderung im Pseudopodienplasma durchbrechen können. Gordin (1952), Franke (1954), Bessis (1956), Kosenow (1956) u. a. haben dieses Phänomen auch beobachtet, sind aber nicht näher auf seine Ursachen eingegangen. Nach unseren Beobachtungen läuft das Barrierephänomen in Phasen ab. Zuerst bildet sich vor den dicht gelagerten Granula ein schmaler Cytoplasmasaum, der sich dann sowohl nach vorn als auch seitlich schnell vergrößert. Unter dem Phasenkontrastmikroskop zeigt sich, daß dieser Bezirk häufig einzelne feinste Granula enthält, die sich heftig bewegen. Diese Beobachtung schließt die Annahme aus, das Pseudopodienplasma besitze eine höhere Viskosität als das übrige Cytoplasma. Wir führen das Barrierephänomen auf das Vorhandensein netzartiger Plasmastrukturen zurück, die als Rest der ehemaligen Zellgrenzschicht erhalten sind. Für kurze Zeit bleiben diese netzartigen Strukturen als Barriere bestehen und verhindern den Durchtritt größerer Granula, während feinste korpuskuläre Elemente passieren können. Das Aufbrechen der Barriere ist zeitabhängig. Sie wird zuerst an der Stelle durchlässig, an der das erste Cytoplasma ausgeflossen ist. Es bricht die Barriere der ehemaligen Zellgrenzen nach kurzer Zeit enzymatisch auf.

Eine andere Art intrazellulärer Granulabewegung sieht man im Bereich der Zentriolen. Aus der Peripherie wandern von überall her Granula auf das Cytozentrum zu, so daß die Granula sternförmig um das Cytozentrum angeordnet erscheinen. Das wird besonders in sehr flach ausgebreiteten Zellen sichtbar. Nach Altmann (1957) sind solche persistierenden Zellstrukturen bei Riesenzellen in granulomatösen Lungenprozessen als Degenerationszeichen zu werten. Es ist jedoch sicher, daß persistierende Zentriolenstrukturen in Leukozyten zum normalen Zellbild gehören. Bessis (1956) hat sie elektronenmikroskopisch nachgewiesen; wir haben sie auch an Blutzellen des Frosches im Phasenkontrastmikroskop gesehen. Daß die Zentriolen in der Hämatologie auch heute noch unbeachtet sind, ist wohl vor allem auf die Artefaktbildung beim Fixieren und die schlechte Anfärbbarkeit zurückzuführen.

Die zentripetalen Granulabewegungen zum Cytozentrum bringen wir mit dem innerzellulären Stofftransport in Verbindung. Auf diese Weise werden an Granula adsorbierte Stoffe rascher aus der Peripherie in mittlere Zellbereiche gebracht.

Kuhl (1941) hat ähnliche Zentripetalbewegungen an Cytoplasmateilchen von *Noctiluca miliaris* kinematographisch festgehalten, die er in ähnlicher Weise interpretiert.

Erstes Degenerationszeichen ist bei allen Leukozytenarten die Chromatinverdichtung an der Kernmembran und die deutliche Vergröberung der Kerninnenstrukturen. Die Kernwandverdichtung ist an Granulozyten nicht ganz leicht zu beurteilen, da ihre Kerne schon in frischem Zustand randständiges Chromatin haben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Low und Freeman (1958) u. a. zeigen diese Besonderheit. Deutlicher sind die ersten Degenerationszeichen an den Kerninnenstrukturen zu erkennen. Im ersten Degenerationsstadium verklumpen sie zu wolkenähnlichen Gebilden. Die Vitalität der Leukozyten ist durch diesen Vorgang aber offensichtlich noch nicht eingeschränkt; die Migration wird jedenfalls nicht beeinflußt. Wir haben sogar beobachtet, daß sich unter höheren Temperaturen von frischen Granulozyten kernlose Plasmainseln abschnüren und selbständig amöboid wandern. Obwohl alle wichtigen Nucleinsäuren vom Kern synthetisiert und je nach Bedarf über einen Schleusenmechanismus an das Cytoplasma abgegeben werden, tritt eine Funktionsstörung erst dann ein, wenn die im Cytoplasma vorhandenen Reserven verbraucht sind. In den Leukozyten sind die wichtigen energieliefernden Stoffwechselsubstrate zur Zeit der ersten Kernveränderungen noch in ausreichendem Maße vorhanden.

Es folgt dann die Entwicklung der groben Granula. Anfänglich sieht man in den neutrophilen Granulozyten große und kleine Granula nebeneinander. Die großen Körnchen sind spezifische Granula und Mitochondrien, wie Bessis (1956), Low und Freeman (1958) u. a. elektronenmikroskopisch gezeigt haben. Im Phasenkontrastmikroskop sind die Mitochondrien erst nach 6—12 Std von den spezifischen Granula zu unterscheiden; ihr Durchmesser ist von etwa 0,5 μ auf 1 μ gewachsen und sie imponieren jetzt als „grobe" Granula. Auf die Vergröberung der Granula in degenerierenden neutrophilen Granulozyten hat v. Philipsborn (1934) hingewiesen und sie als emulsivtropfige Entmischung erklärt. Bessis (1956) sieht in der degenerativen Schwellung der Granula eine Vakuolisierung als Folge von Wasseraufnahme. Wir sind mit Zollinger (1948, 1950) der Meinung, daß es sich bei den groben Granula um degenerierende Mitochondrien handelt, die möglicherweise Stoffwechselschlacken speichern und sich dabei in grobe Granula umwandeln. Dieser Vorgang spielt sich nicht bei allen Mitochondrien gleichzeitig ab, weil die älteren eine größere Permeabilität der Membran aufweisen.

In Lymphozyten entwickeln sich sämtliche Körnchen zu groben Granula. Nöller (1952), Dost und Rind (1956) haben in Lymphozyten neben den Granula noch „Glanzkörner" beobachtet, die stark doppelbrechend sind und histochemisch als Lipochondrien erkannt wurden. Wir fanden sie vereinzelt auch in Lymphozyten gesunder Versuchspersonen. In degenerierenden Lymphozyten sieht man sie häufiger. Auch in Monozyten haben wir doppelbrechende Glanzkörner gefunden und meinen, daß es auch dort Lipoidkörper sind.

Gleichzeitig mit den Kernveränderungen und dem Entstehen der groben Granula kommt es zur Vakuolenbildung. Die Natur der Vakuolen läßt sich im Vitalpräparat nicht beurteilen. Unter unseren Bedingungen ließen sich keine spezifischen Fett-, Eiweiß- oder Glykogenfärbungen machen. Die Entwicklung

der Vakuolen haben wir aber gut verfolgen können. In den neutrophilen Granulozyten sahen wir zwei Vakuolentypen. In frischen Zellen, gleich nach der Präparatherstellung, können schon Vakuolen vorhanden sein, die bereits in vivo entstanden sein müssen. Diese Vakuolen werden meist bald in das umgebende Blutplasma abgegeben. Bei anderen Zellen kommt es erst in vitro zur Bildung von zunächst kleinsten Bläschen, die in 10—20 min von etwa 2 μ auf 5 μ anwachsen. Sie entstehen zwischen den Granula und verändern mit der Zellform ihre Lage. Sie rücken später zur Peripherie, meist in die Nähe des Endkörperchens, wo sie dann von der Zelle ausgestoßen werden. Im Cytoplasma hinterlassen sie keine Spuren. Sie werden in toto ausgestoßen und bleiben im Blutplasma erhalten. Wenn Zellen über Bläschen im Blutplasma wandern, kann der Eindruck entstehen, als befänden sich diese in der Zelle; tatsächlich werden sie aber nur überwandert.

Franke (1954) und Bessis (1956) vergleichen die Vakuolen mit den kontraktilen Vakuolen der Protozoen. Nach unserer Ansicht darf man die in den Granulozyten gebildeten Vakuolen nicht den kontraktilen Vakuolen gleichsetzen. Von den neutrophilen Granulozyten werden sie, wie beschrieben, in toto ausgestoßen und bleiben im Blutplasma erhalten. Beim Entleeren der kontraktilen Vakuolen bleiben immer Vakuolenreste im Cytoplasma zurück; der ausgestoßene Vakuoleninhalt verteilt sich im umgebenden Medium. Außerdem liegen die kontraktilen Vakuolen immer im mittleren Bereich der Protozoen und entleeren sich von dort aus. Dagegen ist die Ausschleusung der Vakuolen aus den Granulozyten in der Nähe des Endkörperchens typisch. Wir halten deshalb die endozelluläre Bildung von Vakuolen in neutrophilen Granulozyten für einen Ausdruck der Exkretion von Stoffwechselschlacken, verbrauchten und aufgelösten Cytoplasmabestandteilen.

Hansen und Rominger (1955), Bessis (1956), Kosenow (1956) u. a. haben beobachtet, daß neutrophile Granulozyten Vakuolen aufnehmen. Bessis (1956) hat diesen Vorgang als „Pinozytose" gekennzeichnet. Der von Lewis (1934) geprägte Begriff trifft nach unseren Beobachtungen aber nur für Monozyten zu. Daß neutrophile Granulozyten die Fähigkeit zur Pinozytose im Sinn der Definition besitzen, haben wir nicht feststellen können.

Nur bei den Monozyten entspricht der Modus der Vakuolenbildung der Pinozytose; er ist für sie charakteristisch. Die Zellen senden sehr dünne Plasmaschleier aus, die Blutplasma einschließen. Im Zentrum eines solchen Cytoplasmaschleiers entsteht dann eine Vakuole, die langsam zur Zellmitte, in die Nähe des Zentriolenapparates wandert. Auch sie wird später wieder ausgestoßen. Im Gegensatz zu der Ausschleusung aus den neutrophilen Granulozyten ist die Abgabe der Vakuolen aus den Monozyten nicht an einen bestimmten Ort gebunden. Tompkins (1955) hat die Vakuolenbildung und -abgabe bei Monozyten als Stoffaufnahme und -abgabe im Sinn physiologischer Exkretion gedeutet. Vakuolen können alle Zellen bilden, doch ist der Modus ihrer Entstehung verschieden. Die Vakuolenbildung in neutrophilen Granulozyten, die schon in vivo stattfinden kann, ist zunächst kein Degenerationszeichen. Erst wenn Vakuolen in großer Zahl und in Zusammenhang mit starken Cytoplasmaveränderungen auftreten, sind sie ein sicheres Degenerationszeichen. In Lymphozyten sind Vakuolen immer Zeichen der Degeneration, denn man findet sie erst, wenn die Mitochondrien geschwollen sind und der normale Zellstoffwechsel zum Erliegen gekommen ist.

Neben den degenerativen Kernveränderungen, dem Entstehen der groben Granula und der Vakuolenbildung, bringt das zweite Degenerationsstadium die ersten Plasmaentartungen. Es entstehen multiple Ausläufer, die durch ihre verschiedenen Bewegungstendenzen eine gerichtete Wanderung der Zelle verhindern. Es folgt dann wieder eine Phase normaler Pseudopodienbildung. Dieses Geschehen wechselt mehrere Male in immer kürzer werdenden Abständen.

Ähnliche multiple Einstülpungen und Vorwölbungen des Cytoplasmas hat Lettré (1951) während der Mitose an Fibroblastenkulturen, Güttes (1958) an Herzfibroblasten beobachtet. Lettré führt die Formänderungen der Fibroblasten auf einen Tonusverlust infolge Energiemangel zurück, weil in der Mitose die ATP-Produktion merklich zurückgeht. Er hat die Atmung durch Zusatz von Fermentblockern experimentell ausgeschaltet und dadurch entsprechende Zellveränderungen auslösen können. Nach intrazellulärer Injektion von ATP hat Goldacre (1950) an Amöben eine Art Zellrigor gesehen; ähnliche Beobachtungen an Granulozyten stammen von Fukushima (1954). Frédéric und Robineaux (1956) haben bei ihren Untersuchungen über die Phagozytose neutrophiler Granulozyten in Exsudaten auch die Bildung multipler Ausläufer beschrieben. Sie halten sie für die normale Form der Ausbreitung von Zellen auf Unterlagen. Unsere Untersuchungen zeigen, daß die multiplen Ausläufer ein erstes Degenerationszeichen des Cytoplasmas sind. Die Degeneration kommt auch in der Störung der Migration zum Ausdruck. Die eingeschalteten Phasen normaler Wanderung deuten auf mehrmalige Kompensation des geschädigten Stoffwechsels. Hartmann (1953) hat Einzeller, die experimentell an der Teilung gehindert wurden, in Assimilation und Wachstum beharren und sich zu Riesenzellen entwickeln sehen. Weil sich in solchen Riesenzellen das Verhältnis von Zellinhalt zu Zelloberfläche immer mehr zugunsten des Volumens verschiebt, gehen sie nach relativ kurzer Zeit zugrunde. Wird das Zellvolumen verkleinert, indem Pseudopodien mikrurgisch abgetrennt werden, dann bleiben die Zellen am Leben. Die Bildung multipler Pseudopodien bei in vitro alternden Leukozyten ist ein Versuch, die Oberfläche zu vergrößern, da große Oberflächen einen besseren Stoffaustausch zwischen Zelle und Medium sichern. Tatsächlich kommt es auch vorübergehend zur Kompensierung der Schädigung des Stoffwechsels. Auf die Phase der reversiblen Plasmaentgleisungen folgt bei allen Leukozytenarten nach wenigen Stunden die Bildung irreversibler multipler Ausläufer.

Bessis (1956) und Kosenow (1956) bezeichnen die irreversible Pseudopodienbildung schlechthin als „Potozytose". Sie übernehmen den Begriff von Zollinger (1948), der Potozytose an degenerierenden Fibrozyten, Flimmerepithel- und Tumorzellen beobachtet hat. Nach der Definition von Metzler (1904) ist Potozytose eine blasenförmige, durch Wasseraufnahme bedingte Abhebung der Zellmembran. Eine Potozytose im Sinne dieser Definition haben wir nur bei Monozyten gesehen; die Potozytoseblasen sind für sie kennzeichnend.

Die irreversiblen Ausläufer schnüren sich später meist ab; manchmal zerfällt die gesamte Zelle in viele kleine Cytoplasmainseln. Albrecht (1958) hat bei der Entkernung der Erythroblasten und bei der Thrombozytenbildung aus Megakariozyten ähnliche Abschnürungen gesehen. Sie vermutet in diesem Vorgang die in vivo stattfindende Thrombozytogenese. Bierman (1955) fand, daß eine größere Anzahl Granulozyten in den Lungenkapillaren zerfällt. In den Pulmonal-

venen hat er als Reste zerfallener Granulozyten rundliche, den Thrombozyten morphologisch und biochemisch weitgehend ähnliche Plasmateilchen gefunden. Auch wir haben in vitro gesehen, wie sich die kettenförmig abgeschnürten Cytoplasmateilchen der neutrophilen Granulozyten schließlich ganz von der Zelle lösen und im Medium davonschwimmen. Diese Abschnürungen entsprechen den Vorgängen, die Bierman (1955) an Granulozyten und Albrecht (1958) an Megakariozyten gesehen haben. Wir haben keinen Anhalt dafür, daß die abgeschnürten Teilchen Eigenschaften von Thrombozyten besitzen. Tompkins (1955) hat beobachtet, wie abgeschnürte Cytoplasmainseln von Monozyten phagozytiert wurden. Wir haben einen derartigen Prozeß nicht gesehen. Vielleicht waren die Monozyten in diesem Stadium schon zu weit degeneriert, um noch phagozytieren zu können.

Gleichzeitig mit den irreversiblen Plasmaentgleisungen kommt es zu weiteren Kernveränderungen. Die Innenstrukturen des Zellkerns haben sich aufgelöst, die Kernwände haben sich weiter verstärkt. Der Kern wird schließlich ganz rund und füllt sich mit einer homogenen Masse. In den neutrophilen Granulozyten können dabei einzelne Kernsegmente zusammenfließen. Sie sind dann leicht mit mononukleären Abbauzellen zu verwechseln. Durch die Form der Ausläufer und die spezifischen Granula lassen sich die Zellen aber auch dann noch differenzieren.

Auch Stein (1955), Bessis (1956), Kosenow (1956) und Hansen (1958) haben diese Kernveränderungen an Granulozyten beschrieben. Die Autoren sprechen von einem „trüben Kern" und übernehmen damit wieder eine Bezeichnung Zollingers (1948), der an anderem Zellmaterial und unter anderen Versuchsbedingungen ähnliche Kernformen gefunden hat. Zollinger hat den trüben Kern an Pharynxepithel- und Sarkomzellen nach Einwirkung von Aqua dest. festgestellt. Zilienbewegungen, die er dabei an den Zellen sah, waren ihm Kriterium der Zellvitalität! Den gleichen Kerntyp haben auch wir bei Leukozyten gefunden, die mit Aqua dest. behandelt waren. Der „trübe Kern" kennzeichnet demnach das Bild des durch Einwirkung von Aqua dest. veränderten Kerns noch intakter Zellen. Die Kernveränderungen an degenerierenden Leukozyten, die dem „trüben Kern" ähneln, beruhen auf autolytischen Vorgängen. Die Zellfunktion der Leukozyten ist zu diesem Zeitpunkt längst erloschen. Wir halten es deshalb für richtiger, hier vom „autolytischen Kern" zu sprechen. Im letzten Stadium lösen sich die Kernreste völlig auf. Gleichzeitig schwillt der Zellrest an; ein Zeichen dafür, daß auch die letzten Stoffwechselreaktionen aufgehört haben.

Im Abbauverlauf der Leukozyten in vitro treten morphologische und funktionelle Veränderungen auf, die kennzeichnend für die einzelnen Degenerationsstadien sind und eine Differenzierung der Zellen in allen Phasen ermöglichen. In gefärbten Präparaten sind degenerierende Leukozyten nicht leicht zu erkennen, weil sich die Granula alternder Zellen nur schwer anfärben lassen und die Anfärbbarkeit des Cytoplasmas nicht typisch ist. Beim Anfertigen der Ausstrichpräparate lösen sich meist auch die degenerativen Ausläufer von den Zellen, so daß es dann zu Verwechselungen z. B. von neutrophilen Granulozyten mit Normoblasten kommen kann (Kaznelson 1918). — Beide Zellarten haben im gefärbten Präparat einen kleinen Rundkern, wenig Granula und schwach azidophiles Cytoplasma (Koch und Lübbers 1950). Auch im Phasenkontrastmikroskop sehen sich verschiedene Abbauzellen in vitro in bestimmten Degenerationsstadien

ähnlich. Durch ihre spezifischen Granula und die für jede Zellart typische Form der Ausläufer lassen sie sich aber gut voneinander unterscheiden.

Die in vitro beobachteten Abbauformen entsprechen weitgehend denen, die in vivo auftreten. In neutrophilen Granulozyten findet man gleich nach der Präparatherstellung Vakuolen, die schon in der Blutbahn entstanden sein müssen. Auch die Bildung grober Granula in vivo ist bekannt. Man findet sie bei schweren Infekten als „toxische Granulation" in Blutausstrichen sowie in Speichel- und Harnzellen. Die multiplen reversiblen und irreversiblen Pseudopodien haben wir an Speichelzellen ebenfalls beobachtet. Simpson (1943) sah sie an Exsudat- und Eiterzellen.

Die Abschnürung multipler Pseudopodien von Leukozyten in Lungenkapillaren ist von Bierman u. Mitarb. (1955) beschrieben worden. Autolytische Kernveränderungen hat Haupt (1954) in Liquorzellen gefunden. Alle Autoren beschreiben aber jeweils nur Einzelformen der Leukozytendegeneration. Dadurch kann der Eindruck entstehen, daß verschiedene Abbauformen typisch für bestimmte Organe oder Krankheiten sind. Tatsächlich handelt es sich aber bei diesen Befunden um einzelne Stadien des Abbaugeschehens.

Da sich alle in vivo erhobenen Befunde in unser Degenerationsschema einordnen lassen, halten wir es für wahrscheinlich, daß der Leukozytenabbau in vivo ähnlich verläuft wie in vitro. Ob die Zeiten der einzelnen Phasen einander entsprechen, sei dahingestellt. Wenn nicht alle Degenerationsformen auch im kreisenden Blut zu finden sind, so wohl deswegen, weil die Leukozyten schon frühzeitig in Milz, Leber und Lunge zurückgehalten werden und dort zugrunde gehen. Die Kenntnis der leukozytären Abbauformen ist unseres Erachtens eine unerläßliche Grundlage sowohl für die Differenzierung von Abbauzellen in Speichel, Harn, Liquor und Exsudat, als auch für experimentelle hämatologische Untersuchungen. Unter der Wirkung von Pharmaka können Reaktionen auftreten, die auch während der normalen Degeneration ablaufen. So sah Henderson (1928) multiple Pseudopodien unter Adrenalineinfluß und andere Autoren haben Plasmaabschnürungen bei Lymphozyten nach Zusatz von Cortison beschrieben. Der normale Degenerationsverlauf muß also bekannt sein, wenn man Fehlbeurteilungen ausschließen will.

Wir haben neutrophile Granulozyten und Lymphozyten als biologische Testobjekte benutzt und an ihnen die Wirkung von Mitochondrienpräparaten untersucht. Aus den Abweichungen vom normalen Degenerationsverlauf konnten wir Rückschlüsse auf die Wirkung der Mitochondrienpräparate ziehen. Bierling (1960) sah bei der Prüfung von Cytostatica an Cervix-Karzinomzellen in der Auflösung der Nucleolen — d. h. in morphologischen Veränderungen — ein Kriterium der Wirksamkeit.

Zusammenfassung

1. In Deckglaspräparaten wurden überlebende Leukozyten mit dem Phasenkontrastmikroskop bis zum Zelltod beobachtet.

2. Die Degeneration der Leukozyten verläuft auf Grund morphologischer und funktioneller Kriterien in vier Etappen, die je nach Leukozytenart verschieden lang sind.

3. Das erste Stadium ist durch Kernwandverdichtung, Bildung grober Granula und Vakuolen gekennzeichnet. Im zweiten Stadium treten reversible multiple

Pseudopodien auf, die mehrmals mit normalen Pseudopodien abwechseln. Die multiplen Ausläufer werden im dritten Degenerationsstadium irreversibel; die Kerne verändern sich in dieser Phase autolytisch. Im letzten Stadium sind die Zellen bewegungslos, sie schwellen langsam an und verlieren ihre Struktur.

4. Veränderungen der amöboiden Bewegung, die Vakuolenbildung, Pinozytose und Potozytose, die autolytischen Kernveränderungen und die Differenzierung degenerierender Leukozyten werden diskutiert.

Literatur

Albrecht, M.: Studien über die Leukocytenbewegung und deren Beeinflußbarkeit in vitro. Dtsch. med. Wschr. **79**, 1431 (1954).

Altmann, H. W.: Allgemeine Morphologie der Zelle. Das Cytozentrum. In Handbuch der gesamten Hämatologie, herausgeg. von Heilmeyer u. Hittmair, Bd. I, S. 121—122. München-Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1957.

Ballowitz, K. u. L.: Leukocytenveränderungen durch Immunseren in Knochenmarkkulturen. Z. Immun.-Forsch. **111**, 90—109 (1954).

Baudisch, W.: Beitrag zur Klebrigkeit der Leukocyten. Naturwissenschaften **44**, 238 (1957).

Bessis, M.: La Mort cellulaire. Hochschulfilm W 387 T. Institut für wissenschaftlichen Film Göttingen.

— Cytology of blood and blood forming organs. New York: Grune and Stratton 1956.

Bierling, R.: Der Blutspiegelnachweis des Cytostaticum TAB (Trisäthyleniminobenzochinon) im Gewebetest. Ther. Ber. (Bayer) **32**, 252—255 (1960).

Bierman, H. R., K. H. Kelly and F. L. Cordes: The sequestration and visceral circulation of leucocytes in man. Ann. N.Y. Acad. Sci. **59**, 850—862 (1955).

Dippel, A., u. H. Nieth: Leukocyten unterschiedlicher Vitalität im Urinsediment. Medizinische **1958**, 47—49.

Dost, F. H., u. H. Rind: Die Lymphocytenglanzkörner als hämatologische Neuigkeit beim Morbus haemolyticus neonatorum. Dtsch. med. Wschr. **81**, 333—336 (1956).

Engel, H. J.: Wirkung von Mitochondrienpräparaten auf Leukocyten in vitro. Berl. Med. **11**, 432—435 (1960).

Esselier, A. F., u. K. Wagner: Eine Methode zur Messung der Lebensdauer der Granulocyten beim Menschen. Experientia (Basel) 8, 119 (1952).

Franke, H.: Phasenkontrasthämatologie. Stuttgart: Georg Thieme 1954.

Frédéric, F., et R. Robineaux: Cytophysiologie des phagocytes. W—7, Lüttich 1951. Institut für wiss. Film Göttingen.

Fukushima, K.: Dynamic pattern in the movement of leucocyte. Med. J. Osaka Univ. **5**, 231—238 (1954).

Gaulhofer, W. K.: Sind die Speichelkörperchen Lymphocyten oder Neutrophile? Blut **2**, 1—6 (1952).

Giersberg, H.: Untersuchungen zum Plasmabau der Amöben im Hinblick auf die Wabentheorie. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **51**, 150—156 (1922).

Goldacre, J., and I. J. Lorch: Folding and unfolding of protein molecules in relation to cytoplasmic streaming, amoeboid movement and osmotic work. Nature (Lond.) **166**, 497—500 (1950).

Gordin, R.: Toxic granulations in leucocytes. Acta med. scand. Suppl. **270**, 1—32 (1952).

Güttes, E.: Entstehung und Verhalten kernloser Zellfragmente in der Gewebekultur. Naturwissenschaften **45**, 44 (1958).

Gumprecht, F.: Leukocytenzerfall im Blut bei Leukämie und schweren Anämien. Dtsch. Arch. klin. Med. **57**, 523—548 (1896).

Hansen, H. G., u. A. Rominger: Das Phasenkontrastverfahren in der Hämatologie. Hamburg: Storman 1955.

Hargraves, M. M.: Systemic lupus erythematodes and LE-cell phenomenon. Postgrad. Med. **16**, 164—174 (1954).

Hartmann, M.: Allgemeine Biologie, S. 440—446. Stuttgart: Gustav Fischer 1953.

Haupt, H.: Über nekrobiotische Vorgänge an Liquorzellen. Z. Kinderheilk. **74**, 519—529 (1954).

Heilmeyer, L., u. I. v. Mutius: Auftreten von Abbauformen im strömenden Blut nach Aderlaß als Ausdruck einer besonderen Konstitution. Klin. Wschr. **24**, 339—341 (1946).

Henderson, M.: A review of the motility of the leucocyte of the blood with additional observations. Anat. Rec. **38**, 71—95 (1928).

Kaznelson, F.: Seltene Zellformen des strömenden Blutes. Dtsch. Arch. klin. Med. **128**, 131—150 (1918).

Kline, D. L., and E. E. Cliffton: The life span of leucocytes in the human. Science **115**, 363—368 (1952).

Koch, E.: Über leukocytäre Abbauzellen. Klin. Wschr. **29**, 474—476 (1951).

—, u. P. Lübbers: Über das Auftreten leukocytärer Abbauformen im peripheren Capillarblut bei entzündlichen Erkrankungen. Dtsch. Arch. klin. Med. **196**, 268—278 (1949).

Koeffler, H.: Die Abbauformen der Leukocyten im Citratblut. Dtsch. Arch. klin. Med. **197**, 589—595 (1950).

Kosenow, K.: Lebende Blutzellen im Fluoreszenz- und Phasenkontrastmikroskop. Basel u. New York: S. Karger 1956.

Kuhl, W.: Intrazelluläre Plasmabewegungen bei Noctiluca miliaris. Hochschulfilm C 384. 1941, Inst. f. wiss. Film Göttingen.

Lettré, H.: Zellstoffwechsel und Zellteilung. Naturwissenschaften **38**, 490—496 (1951).

Lewis, W. H.: Zit. bei M. Bessis, Cytology of blood and blood forming organs, p. 195—196. New York: Grune and Stratton 1956.

Low, F. N., and J. A. Freeman: Electron microscopic atlas of normal and leucaemic human blood. New York-Toronto-London: McDraw-Hill 1958.

Lübbers, P., u. E. Koch: Leukocytäre Abbauformen im Blut bei entzündlichen Erkrankungen. Folia haemat. (Leipzig) **70**, 127—131 (1950).

Metzler, A.: Zit. bei U. Zollinger, Cytologic studies with the phase microscope. Morphologic changes associated with the death of cells in vivo and in vitro. Amer. J. Path. **24**, 569—589 (1948).

Nöller, H. G.: Lymphocytenglanzkörner. Ärztl. Forsch. **6**, 188—191 (1952).

Ottesen, I.: Über das Alter menschlicher Leukocyten im peripheren Blut. Acta physiol. scand. **32**, 75—93 (1954).

Parrisius, W., u. W. Schlopsnies: Über Absterbevorgänge an den weißen Blutkörperchen in vitro. Folia haemat. (Leipzig) **34**, 90—101 (1927).

Philipsborn, E. v.: Untersuchungen über die weißen Blutzellen auf dem geheizten Objekttisch. Dtsch. Arch. klin. Med. **146**, 346—354 (1925).

— Über die Nekrobiose der Leukocyten gesunder und kranker Menschen im Quarzdeckglaspräparat. Dtsch. Arch. klin. Med. **155**, 186—198 (1934).

Resegotti, L.: Life cycle of granulocytes and lymphocytes. Acta physiol. scand. **41**, 325—339 (1957).

Schilling, V.: Über hochgradige Monocytosen mit Makrophagen bei Endocarditis ulcerosa. Z. klin. Med. **88**, 376—397 (1919).

Schneider, W.: Biologische Veränderungen der neutrophilen Leukocyten im konservierten Blut. Langenbecks Arch. klin. Chir. **273**, 298—299 (1953).

Schuhmacher, S.: Die Mundhöhle. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie, herausg. von W. v. Möllendorff, Teil 1. Berlin: Springer 1927.

Simpson, R. E. H.: Criteria of life and death in human pus cells. Brit. J. exp. Path. **24**, 218—223 (1943).

Stein, D. R.: Der Zungenbelag als diagnostisches Problem im Phasenkontrastmikroskop. Med. Inaug.-Diss. Berlin 1955.

Thomas, G.: Absterbe- und Degenerationserscheinungen konservierter Blutzellen im Phasenkontrastmikroskop. Med. Inaug.-Diss. Leipzig 1953.

Tompkins, E. H.: The monocyte. Ann. N.Y. Acad. Sci. **59**, 732—745 (1955).

Undritz, E.: Über das Vorkommen von Abbauzellen der Leukocyten im Blut. Folia haemat. (Leipzig) **65**, 195—202 (1941/42).

Valentine, W. N., u. W. S. Beck: Zit. bei W. Remmle, Atmung und Glykolyse der Leukocyten. Acta haemat. (Basel) **13**, 104—123 (1955).

Warburg, O., K. Gawehn u. A. W. Geissler: Stoffwechsel der weißen Blutkörperchen. Z. Naturforsch. **13** b, 115—116 (1958).
Willstädter, R., u. M. Rhodewald: Zit. bei W. Remmle, Atmung und Glycolyse der Leukocyten. Acta haemat. (Basel) **13**, 104—123 (1955).
Zerbst, E.: Absterbeerscheinungen neutrophiler Granulocyten in vitro. Med. Inaug.-Diss., Berlin 1956. Berl. Med. 8, 444—449 (1957).
Zollinger, U.: Cytologic studies with the phase microscope. Morphologic changes associated with the death of cells in vitro and in vivo. Amer. J. Path. **24**, 545—567, 569—589, 797—811, 1039—1051 (1948).
— Was sind Mitochondrien? Naturwiss. Umsch. **11**, 348—350 (1950).

Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. Engel,
Physiologisches Institut der Freien Universität Berlin
Berlin-Dahlem, Lentzeallee 75

Zeitschrift für Zellforschung 54, 530—540 (1961)

Department of Anatomy, Albert Einstein College of Medicine, New York, N.Y.

NEUROSECRETION. XII. THE FORMATION OF NEUROSECRETORY GRANULES IN THE EARTHWORM, *LUMBRICUS TERRESTRIS* L.*

By

Ernst Scharrer and Stanley Brown

With 5 Figures in the Text

(Received April 24, 1961)

Introduction

There is as yet little agreement among investigators concerning the role of formed cellular constituents in the origin of neurosecretory granules. On the basis of observations with the light microscope Ito and Oishi (1950) advocated the transformation of mitochondria into secretory granules in the cells of the preoptic nucleus of the toad, *Bufo vulgaris*. Our own experience with the same material did not confirm their conclusions. Similar proposals made by Green and Maxwell (1959), according to whom "the antidiuretic hormone is formed by mitochondria distributed along the course of supraoptic neurons" of the rat, and by Nishiitsutsuji-Uwo (1960), who concluded that neurosecretory granules in the pars intercerebralis of several species of *Lepidoptera* "may originate from mitochondria" are not documented by adequate electron micrographs.

The role of the nucleus is equally uncertain; in a few species of fishes and crustaceans, secretory granules appear within the nuclei of secreting nerve cells (E. Scharrer 1934, Palay 1943, Enami 1951, Levinson 1952), but in the majority of cases no evidence of a direct involvement of the nucleus has been noted.

A relationship between neurosecretory granules and the Nissl bodies has been observed in many cases (Scharrer, Palay and Nilges 1945; Bargmann 1949; Hild 1950; Gabe 1951, 1953; Arvy and Gabe 1952a, b). „Solche Bilder geben den Eindruck, daß die Nissl-Schollen in der Bereitung der Sekretgranula aufgebraucht werden. Es gibt jedoch viele Fälle, in denen die feinsten, mit stärkster Vergrößerung eben sichtbaren Körnchen überall im Zelleib ohne deutliche Beziehung zu den gröberen Nissl-Schollen zu finden sind. Damit soll nicht ausgeschlossen werden, daß auch diese Körnchen auf Kosten der überall im Zytoplasma fein verteilten Nissl-Substanz entstehen, aber eine solche Beziehung ist schwer beweisbar. Mit den gewöhnlichen histologischen Methoden können nur verhältnismäßig grobe Aggregate von Nissl-Substanz und Neurosekret sichtbar gemacht werden. Ihre Lagebeziehung zueinander in diesem Größenbereich kann, muß aber nicht bedeuten, daß zwischen dem Entstehen der einen und dem Verschwinden der anderen ein Kausalverhältnis besteht." (E. and B. Scharrer 1954, pp. 975—976).

Special interest attaches to the Golgi apparatus because an important role in the secretion of proteinaceous products has been assigned to Golgi elements by numerous investigators. A secretory cycle of "Golgi spheroids" was described

* This research was aided by grants (B-840, B-2145 and 2M-6418) of the United States Public Health Service.

by THOMAS (1949) in sympathetic ganglion cells of the mouse. This author asserted that neurosecretory granules are formed in the course of this cycle which enter the nuclei of the cells. In *Tabanus (Diptera)*, M. THOMSEN (1951) discussed the relationship between Golgi bodies and neurosecretory granules. According to LEVINSON and PLATANOVA (1948, quoted from DUPONT-RAABE 1951) the Golgi apparatus is either absent or, if present, is greatly reduced in size in the neurosecretory cells of the honey bee. The significance of this observation was questioned by DUPONT-RAABE (1951) who found no difference between the Golgi apparatus in normal nerve cells and that of neurosecretory cells of phasmids. ROMIEU and STAHL (1952) and ROMIEU, STAHL and COTTE (1953) reported a well developed Golgi apparatus in the secreting nerve cells of the nuclei supraopticus and paraventricularis of the guinea pig and the cat. The same is true, according to ITO and OISHI (1950), for the neurosecretory cells of the nucleus praeopticus of the toad *(Bufo vulgaris)*. In the crab *Sesarma*, the neurosecretory material appears in the living cells of the x-organ under phase contrast in an area presumably occupied by the Golgi apparatus (PASSANO 1952). On the basis of electron microscopic observations, PALAY (1960) suggested that the small droplets in the neurosecretory cells of the preoptic nucleus of the goldfish "arise primarily in the cisternae of the Golgi complex"[1].

Finally, since synthetic "protenoids", i.e. polymeric preparations containing, in peptic linkage, all or most of the amino acids common to proteins, are capable of forming granules of approximately 2 μ in diameter in vitro (FOX 1960), the possibility must be considered that neurosecretory granules simply precipitate without the assistance of any particular structure in the cell.

Clearly, the process by which nerve cells elaborate protein granules deserves to be reinvestigated.

Material and Methods

The dorso-caudal part of the supraesophageal ganglion ("brain") of the earthworms *(Lumbricidae)* contains numerous nerve cells whose exceedingly small secretory granules stain conspicuously with various techniques. These cells were found particularly suitable for our purpose. The first to fix them with 1% osmium tetroxide was probably FRIEDLÄNDER (1888), who described them as follows: „Die ganze dorsale Partie des Gehirns stellt eine hauptsächlich aus Ganglienzellen bestehende Rindenschicht dar. Diese Ganglienzellen zeichnen sich namentlich durch die Schwierigkeit aus, sie zu konservieren. Schon die Grenzen der einzelnen Zellen sind schwer zu erkennen; die Zahl ihrer Fortsätze zu bestimmen oder auch letztere nur deutlich zu sehen, war mir unmöglich."

We used large (4 to 5 g) freshly collected specimens of *Lumbricus terrestris* L. whose supraesophageal ganglion was made accessible by a dorsal skin incision. The ganglion was fixed in situ by flooding with 1% OsO_4 solution buffered at p_H 7.8 according to PALADE's (1952) formula. The neurosecretory cells can be recognized under the dissecting microscope by their silvery appearance against the rest of the brain tissue which becomes dark as the osmic acid penetrates. The area containing the densest accumulation of neurosecretory cells was removed after about 15 minutes fixation in situ, placed in fresh fixative for another 45 minutes and then dehydrated in the usual fashion. Tissues embedded in methacrylate proved unsuitable for the study of the process of formation of granula. All the material used in this investigation was embedded in Epon 812. The sections were stained with uranyl acetate. Photographs were taken with an RCA EMU 3E microscope at 50 KV.

[1] In a paper by Professor HOWARD Bern, Dept. of Zoology, University of California at Berkeley, to be published in the Journal of Ultrastructure Research, corresponding observations in the leech will be reported.

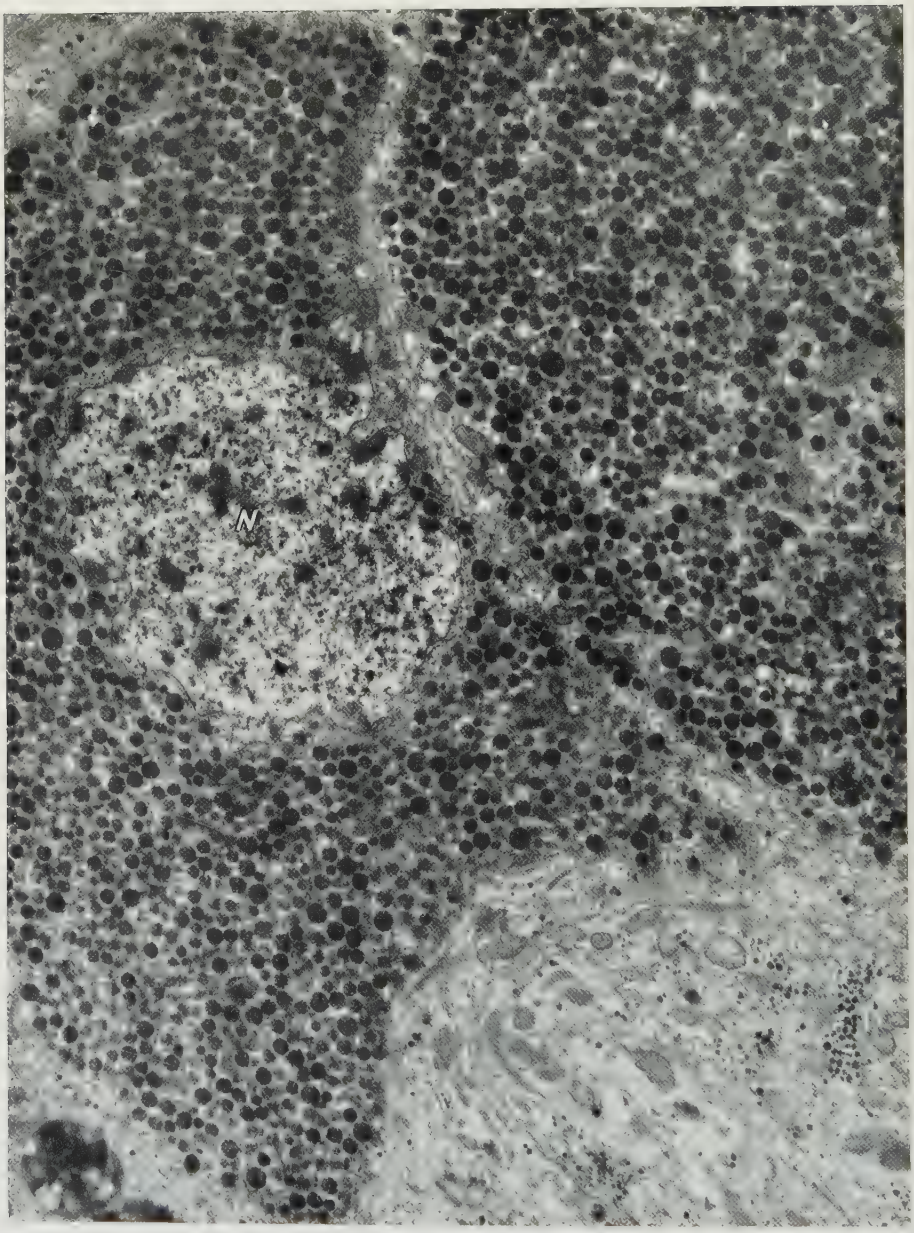


Fig. 1. Partial views of two neurosecretory cells, one with nucleus (*N*) in the supraesophageal ganglion of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. The cytoplasm contains many secretory granules. Magnification × 10000

Results

Since the first description of neurosecretory cells in oligochete and polychete worms (B. Scharrer 1936, 1937; E. and B. Scharrer 1937) many investigations have been published dealing with the structure and function of these elements. Concerning the family *Lumbricidae*, Harms (1947—1949) considered the neuro-

secretory cells as a mass of extracerebral tissue ("Cerebralorgan"), a view not supported by the findings of other investigators. The various tinctorial affinities of neurosecretory cells in the earthworm brain have been interpreted as indicating different cell types involved in specific functions such as reproduction, regeneration, etc. (HARMS 1947—1949; HUBL 1953, 1956a, b; HERLANT-MEEWIS 1955, 1956).

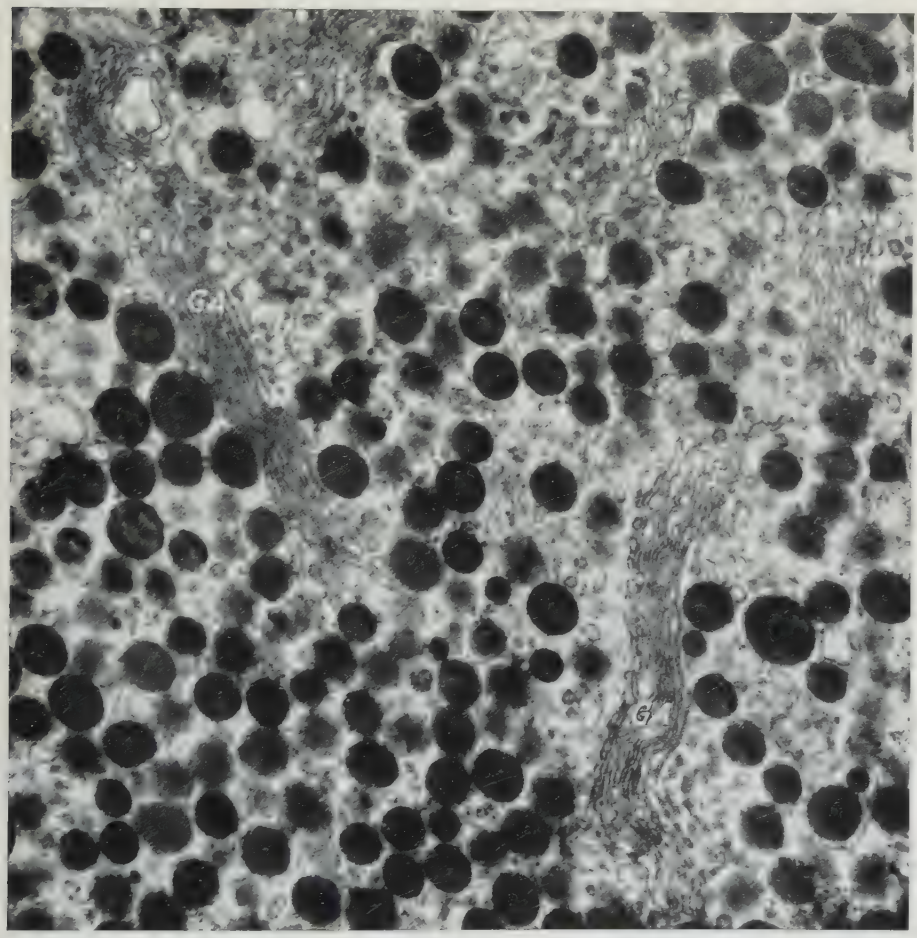


Fig. 2. "Inactive" Golgi apparatus (*GA*) in neurosecretory cells of the earthworm, surrounded by granules. Magnification × 36000

1956/57; MICHON and ALAPHILIPPE 1959) or as different stages in the secretory cycle of one and the same cell type (BRANDENBURG 1956)[1]. Electron micrographs of the area containing neurosecretory cells show a multitude of elements exhibiting considerable variation in fine structure. We shall not attempt here to deal with their significance with respect to the question of cell types, but concern ourselves only with the problem of the formation of the secretory granules. Figure 1 shows parts of two neurosecretory cells at low magnification, illustrating the size, general appearance and quantity of the cytoplasmic inclusions.

[1] See also OTREMBA, Z. Zellforsch. **54**, 421—436 (1961).

In the introduction several possible sites of origin of these granules were named. Among them the Golgi apparatus is of particular interest. It is well developed,

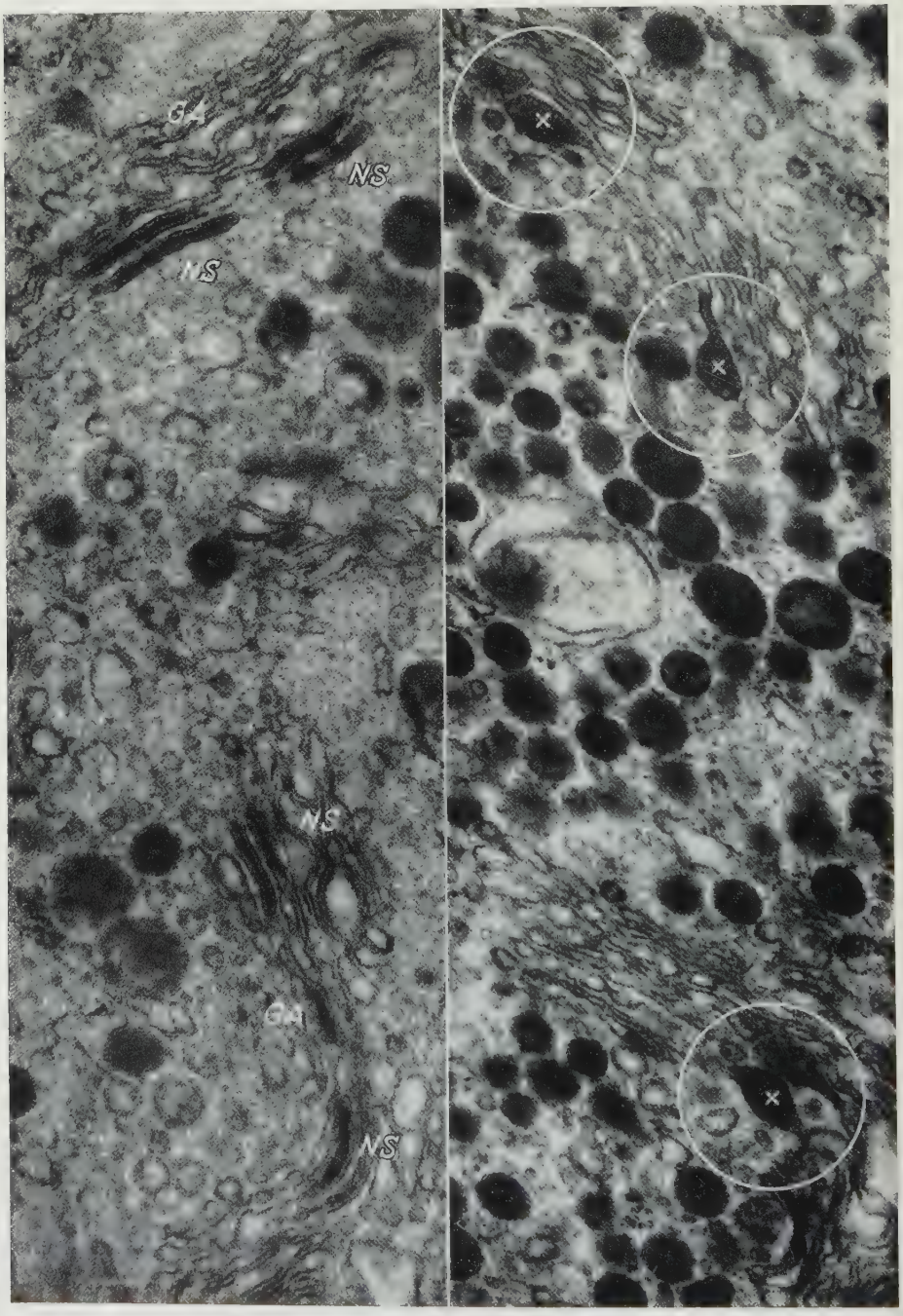
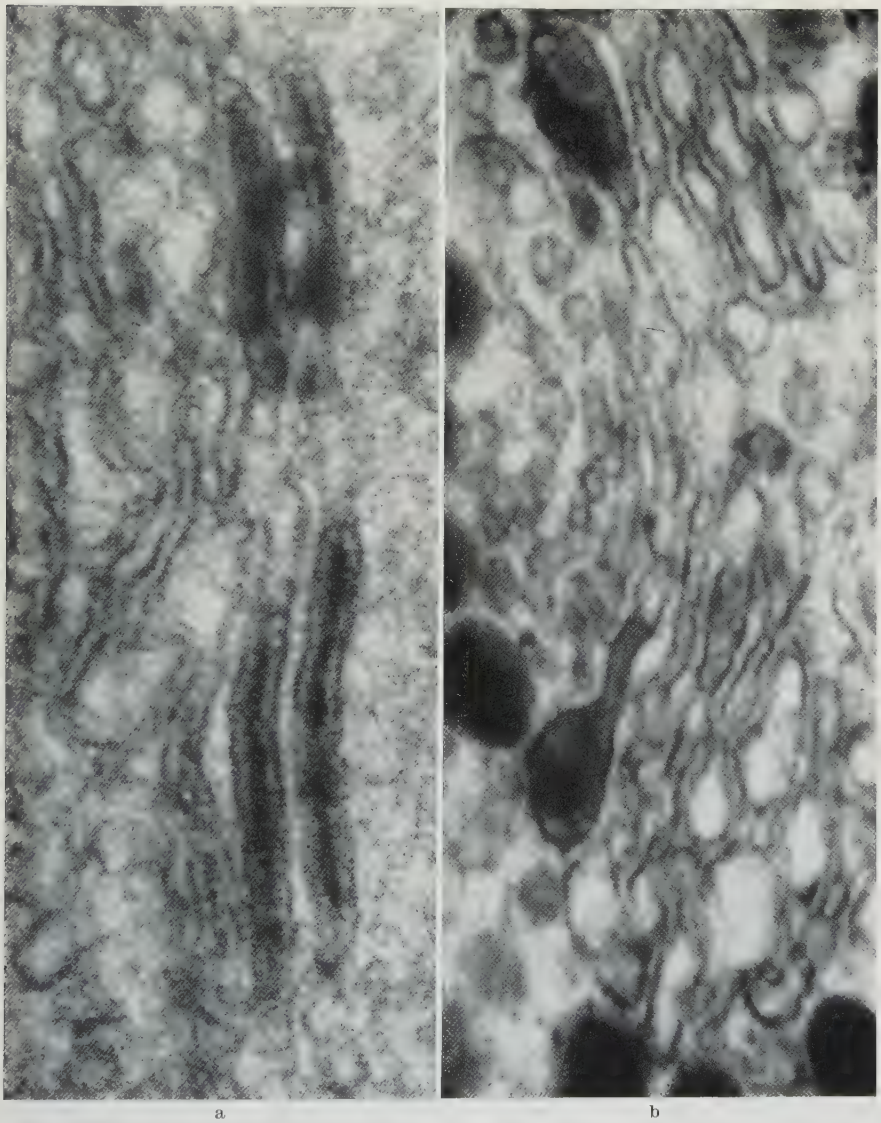


Fig. 3a and b. "Active" Golgi apparatus (*GA*) in neurosecretory cells of the earthworm. a) Segments of neurosecretory material (*NS*) within cisterns. b) "Birth" of granules in the Golgi complex, indicated by circles. Magnification × 40000

although in the case illustrated (Fig. 2) there are no visible indications of a functional relationship to the granules. Cells filled with granules, as the one illu-



a b

Fig. 4a and b. Upper portions of Fig. 3 at higher magnification. a) Note the apparent swelling of the Golgi cisterns containing electron dense material in comparison with nearby empty ones. b) Note continuity of Golgi lamellae with membrane of developing neurosecretory granule. Magnification $\times 100\,000$

strated in Fig. 2, may well be in a storage phase and not actively producing granules. However, the Golgi apparatus evidently plays an important part in the formation of the secretory granules as seen in Figs. 3 and 4. In these cases segments of electron dense material are observed within the membranes of the Golgi apparatus. One cannot help deducing from these admittedly static pictures a sequence whereby the material moves along the intralamellar spaces to become

pinched off at the periphery and to form granules of approximately uniform size. It is also quite obvious that, as in other protein secreting gland cells,

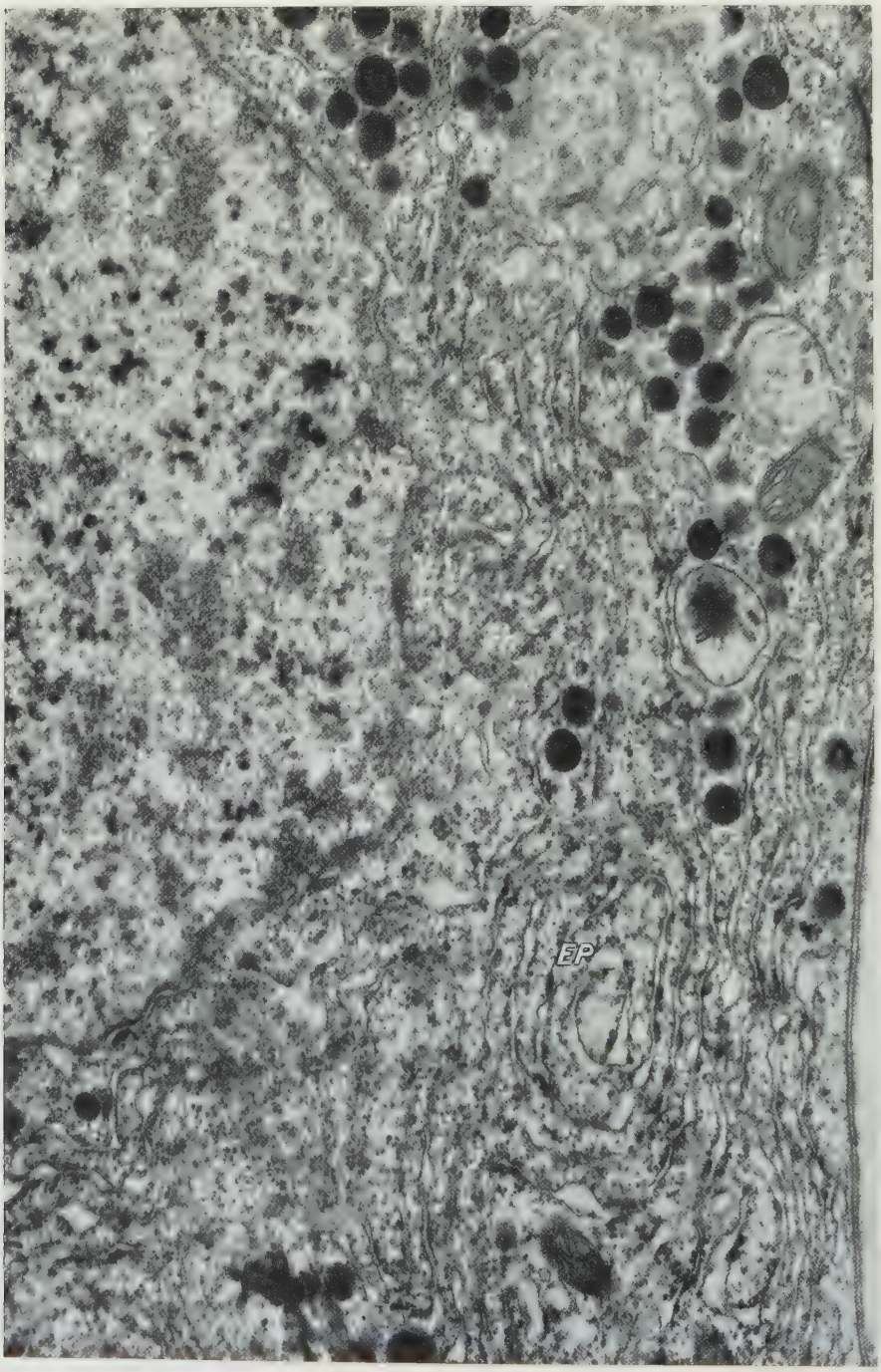


Fig. 5. Location of neurosecretory granules in the intercisternal matrix of the ergastoplasm (*EP*) Magnification × 30000

the Golgi lamellae furnish the membranes that surround the granules. The existence of such membranes was postulated by Pérez-González (1957) who effected the release of chromatophorotropic hormones from inactive neurosecretory granules of crustaceans by the application of agents such as detergents causing the rupture of membranes. At the same time the surface membranes of neurosecretory granules of vertebrates were demonstrated by Palay (1956), Bargmann and Knoop (1957) and Fujita (1957) by electron microscopy.

With the "birth" of the granules thus demonstrated, we may next explore their "pre- and postnatal" life history. It is likely that the antecedents of the material, that becomes so clearly manifest within the Golgi membranes, originate in the ergastoplasm[1] as in other protein secreting cells. However, unlike the acinar cells of the exopancreas of the guinea pig (Palade 1956), no electron dense material is found in the cisternae of the ergastoplasm of the neurosecretory cells of the earthworm to indicate its role in the secretory process. Neither is it observed in the pancreas cells of mammals other than the guinea pig. Until a species is encountered in which the cisternae of the ergastoplasm contain visible precursors of the neurosecretory granules, we can deduce the early events of their synthesis by analogy with the pancreas cells, but we cannot prove it. In the acinar cells of the pancreas the material is thought to pass from the channels of the ergastoplasm into those of the Golgi apparatus. The same assumption may be applicable to the transfer of material from the ergastoplasm to the Golgi apparatus in neurosecretory cells. One function of the Golgi apparatus could well be the removal of water and consequent concentration of the protein to form a pellet.

Whereas the "prenatal" origins of neurosecretory material are largely a matter for conjecture, the "postnatal" events are easier to follow. After having become detached from the Golgi complex the granules accumulate in the perikaryon. In the ergastoplasm they lie between, not within the cisternae (Fig. 5). The organization of the ergastoplasm does not appear to be disturbed by the presence of a few granules, but this seems to happen as the number of granules increases. Eventually large areas of the cell are crowded with granules interspersed with short pieces of cytomembranes and many free ribosomes. How long the granules remain stored in the perikaryon in this way before they are released cannot be determined with the techniques used in the present investigation.

Earlier findings with the light microscope suggested that the granules are formed at the expense of the Nissl substance. This conclusion is not supported by our present observations. The breakdown and dispersal of the endoplasmic reticulum is probably not related to the synthesis of secretory precursors, but to the invasion and storage of mature neurosecretory granules in the intercisternal matrix. This dispersal of the endoplasmic reticulum actually eliminates the source of secretory precursors. As a result, the Golgi apparatus assumes a quiescent appearance in cells filled with granules (Fig. 2). It may be expected that reconstitution of the ergastoplasm and a new cycle of activity of the Golgi complex follow the release of neurosecretory granules from the perikaryon.

[1] The terms ergastoplasm, Nissl substance and endoplasmic reticulum are used as synonyms in this paper (see Palay and Palade 1955, Palay 1956).

This tentative concept of the formation of neurosecretory granules does not provide for an active participation of the nucleus, for which there is no evidence in our photographs. Similarly, the mitochondria do not seem to be involved. They are small, and nowhere do they show changes suggesting that they might become transformed into neurosecretory granules.

Discussion

The classical techniques of neurohistology, such as silver impregnation, have contributed to the concept of the neuron as a highly specialized element constituting a category of its own. However, this image has been modified as a result of studies of the fine structure of nerve cells which turns out to be much less different from that of other cell types than might have been expected. For example, until recent years the Nissl substance has been considered as a specific constituent of nerve cells. It is now clear that the distinction was one of nomenclature rather than of essential properties. Actually, the Nissl substance corresponds to the ergastoplasm of gland cells (Palay and Palade 1955, Palay 1956). Another constituent, uniquely present in nerve cells at magnifications of the light microscope, are neurofibrils. Although demonstrable in the perikaryon by silver impregnation techniques, they do not show up as preformed structures in electron micrographs. Also, at the magnifications of the electron microscope, the appearance of the mitochondria, nuclei and Golgi apparatus does not suggest fundamental differences between neurons and non-nervous elements. These findings are important for the further study of the phenomenon of neurosecretion. They permit us, for example, to compare the formation of neurosecretory granules with corresponding events in the elaboration of secretory products by gland cells in general.

In protein secreting cells the elaboration of the product begins in the ergastoplasm. Specifically, the granules of ribonucleoprotein (ribosomes) lining the ergastoplasmic membranes have been shown to be sites of synthesis. The resulting material is released into the cisterns and channels of the ergastoplasm from which it passes into the Golgi complex. Here the material is concentrated and sequestered as granules whose surface membranes are supplied by the Golgi lamellae. This concept, a composite of the conclusions of investigators who studied a multitude of protein secreting cells (for references see the reviews of Palay 1958 and Hirsch 1961) appears to apply also to neurosecretory cells. Further studies along these lines promise rewarding insights into the processes by which proteinaceous neurohormones are synthesized and packaged for storage and release by nerve cells.

Summary

The granules of neurosecretory cells in the supraesophageal ganglion of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L., are formed by the Golgi apparatus. The process of neurosecretion is discussed in relation to this observation.

Literature

Arvy, L., et M. Gabe: Données histo-physiologiques sur la neuro-sécrétion chez quelques Ephéméroptères. Cellule **55**, 203—222 (1952a).

— — Données histo-physiologiques sur les formations endocrines rétrocérébrales de quelques odonates. Ann. Sci. natur., Zool. **14**, 345—374 (1952b).

Bargmann, W.: Über die neurosekretorische Verknüpfung von Hypothalamus und Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **34**, 610—634 (1949).

—, u. A. Knoop: Elektronenmikroskopische Beobachtungen an der Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **46**, 242—251 (1957).

Brandenburg, J.: Neurosekretorische Zellen des Regenwurms. Naturwissenschaften **43**, 453 (1956).

Dupont-Raabe, M.: Etude morphologique et cytologique du cerveau de quelques phasmides. Bull. Soc. zool. France **76**, 386—397 (1951).

Enami, M.: The sources and activities of two chromatophorotropic hormones in crabs of the genus Sesarma. II. Histology of incretory elements. Biol. Bull. **101**, 241—258 (1951).

Fox, S. W.: How did life begin? Science **132**, 200—208 (1960).

Friedländer, B.: Beiträge zur Kenntnis des Zentralnervensystems von Lumbricus. Z. wiss. Zool. **47**, 47—84 (1888).

Fujita, H.: Electron microscopic observation on the neurosecretory granules in the pituitary posterior lobe of dog. Arch. Histol. jap. **12**, 165—172 (1957).

Gabe, M.: Données histologiques sur la neuro-sécrétion chez les Pterotracheidae (Hétéropodes). Rev. canad. Biol. **10**, 391—410 (1951).

— Particularités morphologiques des cellules neuro-sécrétrices chez quelques Prosobranches monotocardes. C.R. Acad. Sci. (Paris) **236**, 323—325 (1953).

Green, J. D., and D. S. Maxwell: Comparative anatomy of the hypophysis and observations on the mechanism of neurosecretion. In: Comparative Endocrinology, edit. by A. Gorbman, p. 368—392. New York: John Wiley & Sons 1959.

Harms, J. W.: Über ein inkretorisches Cerebralorgan bei Lumbriciden sowie Beschreibung eines verwandten Organs bei drei neuen Lycastis-Arten. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **143**, 332—346 (1947—1949).

Herlant-Meewis, H.: Neurosécrétion chez les Oligochètes. Bull. Acad. roy. Belg., Cl. Sci., V. s. **41**, 500—508 (1955).

— Croissance et neurosécrétion chez Eisenia foetida (Sav.). Ann. Sci. natur., Zool. **18**, 185—198 (1956).

— Reproduction et neurosécrétion chez Eisenia foetida (Sav.). Ann. Soc. roy. zool. Belg. **87**, 151—185 (1956/57).

Hild, W.: Zur Frage der Neurosekretion im Zwischenhirn der Schleie (Tinca vulgaris) und ihrer Beziehungen zur Neurohypophyse. Z. Zellforsch. **35**, 33—46 (1950).

Hirsch, G. C.: Die Zellorganellen und ihre Zusammenarbeit. In: Handbuch der Biologie, herausgeg. von L. v. Bertalanffy u. F. Gessner, Bd. 1, S. 353—408. Konstanz: Akademische Verlagsgesellschaft Athenaion 1961.

Hubl, H.: Die inkretorischen Zellelemente im Gehirn der Lumbriciden. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **146**, 421—432 (1953).

— Ein neuer Typ neurosekretorischer Zellen im Unterschlundganglion der Regenwürmer. Naturwissenschaften **43**, 284 (1956a).

— Über die Beziehungen der Neurosekretion zum Regenerationsgeschehen bei Lumbriciden nebst Beschreibung eines neuartigen neurosekretorischen Zelltypus im Unterschlundganglion. Arch. Entwickl.-Mech. Org. **149**, 73—87 (1956b).

Ito, T., u. K. Oishi: Zytologische Untersuchung der Zwischenhirndrüse von Bufo vulgaris japonicus. Okajimas Folia anat. jap. **23**, 35—50 (1950).

Levinson, L. B.: Die Morphologie der Sekretion in den neurosekretorischen Zellen. [Russisch.] Dokl. Akad. Nauk SSSR., N. s. **83**, 745—748 (1952).

Michon, J., et F. Alaphilippe: Contribution à l'étude de la neurosécrétion chez les Lumbricidae. C.R. Acad. Sci. (Paris) **249**, 835—837 (1959).

Nishiitsutsuji-Uwo, J.: Fine structure of the neurosecretory system in Lepidoptera. Nature (Lond.) **183**, 953—954 (1960).

Palade, G. E.: A study of fixation for electron microscopy. J. exp. Med. **95**, 285—298 (1952).

— Intracisternal granules in the exocrine cells of the pancreas. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, 417—422 (1956).

Palay, S. L.: Neurosecretion. V. The origin of neurosecretory granules from the nuclei of nerve cells in fishes. J. comp. Neurol. **79**, 247—275 (1943).
— An electron microscope study of the neurohypophysis in normal, hydrated and dehydrated rats. Anat. Rec. **121**, 348 (1956).
— Structure and function in the neuron. In: Progress in Neurobiology. I. Neurochemistry. Edit. by S. Korey and J. I. Nurnberger, p. 64—82. New York: Hoeber 1956.
— The morphology of secretion. In: Frontiers in Cytology, edit. by S. L. Palay, p. 305—342. New Haven: Yale University Press. 1958.
— The fine structure of secretory neurons in the preoptic nucleus of the goldfish (Carassius auratus). Anat. Rec. **138**, 417—443 (1960).
Palay, S. L., and G. E. Palade: The fine structure of neurons. J. Biophys. Biochem. Cytol. **1**, 69—88 (1955).
Passano, L. M.: Phase contrast observations on living neurosecretory cells of Sesarma. Anat. Rec. **112**, 460—461 (1952).
Pérez-González, M. D.: Evidence for hormone-containing granules in sinus glands of the fiddler crab Uca pugilator. Biol. Bull. **113**, 426—441 (1957).
Romieu, M., et A. Stahl: Recherches cytologiques et cytochimiques sur les fonctions neurosécrétoires des cellules nerveuses de l'hypothalamus. C.R. Soc. Biol. (Paris) **146**, 1230—1233 (1952).
Romieu, M., A. Stahl et G. Cotte: Cytologie des cellules nerveuses de l'hypothalamus. Acta anat. (Basel) **18**, 74—79 (1953).
Scharrer, B.: Über „Drüsen-Nervenzellen" im Gehirn von Nereis virens Sars. Zool. Anz. **113**, 299—302 (1936).
— Über sekretorisch tätige Nervenzellen bei wirbellosen Tieren. Naturwissenschaften **25**, 131—138 (1937).
Scharrer, E.: Über die Beteiligung des Zellkerns an sekretorischen Vorgängen in Nervenzellen. Frankfurt. Z. Path. **47**, 143—151 (1934).
—, S. L. Palay and R. G. Nilges: Neurosecretion. VIII. The Nissl substance in secreting nerve cells. Anat. Rec. **92**, 23—31 (1945).
—, and B. Scharrer: Über Drüsen-Nervenzellen und neurosekretorische Organe bei Wirbellosen und Wirbeltieren. Biol. Rev. **12**, 185—216 (1937).
— — Neurosekretion. In: Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, Bd. 6, 5. Teil, S. 953—1066, herausgeg. von W. Bargmann. 1954.
Thomas, O. L.: A study of the spheroid system of sympathetic neurones with special reference to the problem of neurosecretion. Quart. J. micr. Sci. **89**, 333—350 (1948).
Thomsen, M.: Weismann's ring and related organs in larvae of Diptera. Kgl. danske Vid. Selsk. biol. Skr. **6**, Nr 5, 1—32 (1951).

Prof. Dr. E. Scharrer, Department of Anatomy, Albert Einstein College of Medicine, Eastchester Road and Morris Park Avenue, New York 61, New York

Zeitschrift für Zellforschung 54, 541—548 (1961)

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. med. W. Bargmann)

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER REPTILIEN- UND VOGELLUNGE*

Von

W. Bargmann** und A. Knoop

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 15. Mai 1961)

Die in der Periode der klassischen Histologie viel umstrittene Frage nach dem Feinbau der respiratorischen Oberfläche der Lunge ist durch die Elektronenmikroskopie in einem entscheidenden Punkte einer Klärung zugeführt worden. Es hat sich nämlich gezeigt, daß Luft und Blutbahn durch eine aus drei Schichten bestehende Barriere getrennt sind. Sie besteht aus dem Kapillarendothel, der Basalmembran der Blutkapillare und aus einem geschlossenen Epithelüberzug. Diese Feststellung gilt jedenfalls für die Lungen der bisher wiederholt untersuchten Wirbeltierklassen, d. h. der Amphibien und der Säuger einschließlich des Menschen; über die Lunge der Reptilien liegen unseres Wissens noch keine elektronenmikroskopischen Studien vor.

Eine Ausnahme scheint die *Lunge der Vögel* insofern zu bilden, als Schulz (1959) auf Grund elektronenmikroskopischer Untersuchungen über das Nichtvorhandensein eines geschlossenen Zellbelages auf den Lungenkapillaren der Taube berichtet. In der Taubenlunge soll überdies an vielen Stellen nicht nur ein bedeckendes Epithel, sondern manchmal auch die Endothelauskleidung der Kapillaren fehlen. Nur eine Basalmembran grenze an diesen Stellen an Blut bzw. Atemluft.

Diese Angaben stehen wenigstens teilweise im Einklang mit älteren Feststellungen von Lichtmikroskopikern (vgl. hierzu das Schema bei Weslaw 1934), welche die Vogellunge wegen der weitgehenden Entblößung ihrer Blutkapillaren von einem Zellüberzug (Bargmann 1935, Stanislaus 1937) an das Ende einer „funktionellen Reihe" stellen. Diese Reihe beginnt mit den Lungen der Amphibien und führt über die Lunge der Reptilien und der Mehrzahl der Säuger, weiter über die der stoffwechselaktiven Insektivoren zur Vogellunge; in ihr ist der Höhepunkt des Angepaßtseins an die respiratorische Funktion erreicht (Bargmann 1936).

An der Lunge eines Insektivoren erhobene Befunde (Bargmann und Knoop 1956) haben uns allerdings daran zweifeln lassen, ob die auf die lichtmikrosko-

* Durchgeführt mit dankenswerter Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

** Herrn Prof. Dr. Wilhelm Hallermann, Direktor des Instituts für Gerichtliche und Soziale Medizin an der Universität Kiel, zum 60. Geburtstag dankbar gewidmet.

pischen Beobachtungen gestützten Aussagen über die Vogellunge trotz der Angaben von Schulz heute noch haltbar sind. Elektronenmikroskopische Untersuchungen haben nämlich gezeigt, daß die Kapillaren in der Lungenalveole des Igels wie die der höheren Säuger einen allenthalben geschlossenen Cytoplasmabelag tragen, der die Basalmembran der Kapillaren von der Atemluft scheidet. Auf Grund früherer lichtmikroskopischer Studien hatten jedoch, wie angedeutet, verschiedene Forscher die Ansicht vertreten, die Kapillaren der Insektivorenlunge würden von Zellen besiedelt, deren Ausläufer weite Bezirke der Kapillarwand unbedeckt lassen (Bargmann 1935 u. a.). Man darf mithin den Verdacht hegen, daß die elektronenmikroskopische Untersuchung auch der Vogellunge zu gleichartigen Ergebnissen führen könnte, d. h. daß sich die lichtmikroskopisch gewonnenen Vorstellungen über eine Uneinheitlichkeit des Strukturplanes der respiratorischen Lungenoberfläche als irrig erweisen könnten. Eine derartige Untersuchung ist auch geeignet, die Stichhaltigkeit der Angaben von Salt und Zeuthen (1960) zu prüfen. Die Autoren, die allerdings von einer Berücksichtigung der in der Literatur mitgeteilten Befunde absehen, schreiben über den Feinbau der Vogellunge: „The air capillaries are lined ba simple cuboidal epithelium near the parabronchi. This epithelium becomes progressively lower as the capillaries branch and decrease in diameter toward the ends, and finally becomes indistinct and fuses wit the epithelium of the blood capillaries". Eine solche Verschmelzung von Epithel und Endothel müßte, wenn sie sich als existent erwiese, als in der Gewebelehre einzig dastehend bezeichnet werden.

Material und Methodik

Licht- und elektronenmikroskopisch wurde die Lunge von zwei Reptilien (Testudo graeca L.) und vier Vögeln (drei Haustauben, 1 Kanarienvogel) untersucht.

1. Lichtmikroskopie. Fixation in Formol 10%, Bouinscher Flüssigkeit. Einbettung in Methylbenzoat-Celloidin-Paraffin. Schnittdicke 6–8 μ. Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin, Azan (M. Heidenhain).

2. Elektronenmikroskopie. a) Schildkröte. 15stündige Fixation in 1%iger isotonischer Osmiumsäurelösung (Locke-Lösung für Kaltblüter), $p_H = 7{,}2$.

b) Taube und Kanarienvogel. 2stündige Fixation in 1%iger bzw. 2%iger isotonischer und gepufferter Osmiumsäurelösung ($\Delta i = -0{,}66$–$-0{,}69$), $p_H = 7{,}4$; zum Teil unter Zusatz von 1% Makrodex hergestellt.

Entwässerung in beiden Fällen in 70-, 90- und 100%igem Äthylalkohol, Einbettung in einem Gemisch aus 10 Teilen Methacrylsäurebutylester und 1 Teil Methacrylsäuremethylester. Alle Schnitte wurden mit dem Porter-Blum-Mikrotom angefertigt und mit einem Siemens-Elmiskop I (80 kV, 50 μ Objektivapertur) aufgenommen. Ein Teil der Schnitte wurde vor dem Mikroskopieren 10 min lang mit einer 5%igen Kaliumpermanganatlösung gefärbt. Diese Anfärbung läßt die Membranen deutlicher hervortreten.

Befunde

1. Lunge der Schildkröte. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Schildkrötenlunge bestätigen die lichtmikroskopisch schon wiederholt getroffene Feststellung (z. B. Ogawa 1922, Rothley 1930), daß die Lungenkapillaren des Reptils von einer geschlossenen *Epithelschicht* bedeckt werden. Dieses Epithel lagert der Außenfläche der *Basalmembran* der Kapillaren dort unmittelbar an,

wo sich diese stark in den Luftraum vorwölben; die Dicke der Basalmembran beträgt an diesen Stellen rund 500 Å. In anderen Bereichen befindet sich zwischen Endothel und Epithel eine wechselnd breite, locker gefügte Zone kollagener Fibrillen, die mit einer dichteren Oberflächenschicht an das Cytoplasma der beiden Zellagen angrenzt. Die Basalmembran ist in diesen Bezirken mithin zu einer stärkeren bindegewebigen Schicht verdickt.

Das *Endothel* besteht aus einer geschlossenen Tapete abgeplatteter Zellen, die sich in ihren Randbereichen teils überlappen, teils in bekannter Weise (Thiel 1957/58, *Testudo graeca*) miteinander falzartig verbinden; es besitzt in den kernfernen Partien eine Höhe von rund 2500 Å. Kleine Mitochondrien sind vor allem in der Umgebung von Endothelkernen vorhanden. Hier befinden sich ferner Komplexe von Golgimembranen. Gelegentlich stößt man auf den Anschnitt eines Zentriols. Das lockere Cytoplasma zeichnet sich durch starke Mikrovesiculation aus.

Die kernhaltigen Abschnitte der *Epithelzellen* liegen, wie bereits lichtmikroskopisch erkennbar, in Kapillarnischen. Im Perikaryon befindet sich die Hauptmasse der unregelmäßig gestalteten, lamellär gebauten Mitochondrien. Die Epithelzellen grenzen teilweise in unregelmäßigen Verzahnungen aneinander, wobei es zur Bildung lakunenartiger Spalten zwischen ihnen kommen kann. Diese Spalten treten besonders in den basalen Zellabschnitten deutlich hervor. An anderen Stellen sind auch Überlappungen der Zellränder feststellbar. Hier wie im Gebiet der Verzahnungen sind zahlreiche, jedoch kleine „Haftplatten" (Desmosomen) ausgebildet. Auch im Epithel findet man Anschnitte von Zentriolen. Die freie Oberfläche der Epithelzellen ist vor allem im Bezirk der Kapillarnischen unregelmäßig gerunzelt und stellenweise zerklüftet. Vielfach ist sie von einer Schleimschicht bedeckt.

Vergleicht man die geschilderten Strukturverhältnisse mit den an der Lunge der Amphibien und Säuger erhobenen Befunde, so stellt man grundsätzliche Übereinstimmung im Aufbau der Respirationsfläche fest.

2. Lunge der Vögel. Auf elektronenmikroskopischen Übersichtsaufnahmen von Schnitten durch die Vogellunge erkennt man das Nebeneinander von Blutkapillaren und luftführenden Kanälchen, den Luftkapillaren, in ziemlich regelmäßiger Verteilung. Die Luftkapillaren erwecken zunächst den Eindruck eines Spaltensystems zwischen den Blutkapillaren, das einer besonderen eigenen Wand zu entbehren scheint. Ihre Weite beträgt rund 50000—60000 Å; teils etwa den gleichen, teils einen etwas geringeren Durchmesser besitzen die Blutkapillaren.

Die Wandung der *Blutkapillaren* besteht aus einem geschlossenen *Endothel*, das im Kernbereich rund 15000 Å, in seinen flachsten Abschnitten nur 500 Å und weniger dick ist, und einer *Basalmembran*, deren Dicke zwischen 400 und 1000 Å schwankt. Die Mikrovesiculation des Cytoplasmas der Endothelzellen ist ausgesprochen. Die Angabe von Schulz, stellenweise fehle ein Endothelbelag, können wir nur insofern bestätigen, als es leicht zu einer artefiziellen Ablösung der Endothelschicht kommt; die einwandfreie Fixierung von Vogelgeweben bereitet, wie schon den Lichtmikroskopikern bekannt, gewisse Schwierigkeiten.

Der Außenfläche der Blutkapillaren lagern in Nischen und Einbuchtungen eingebettete, cytoplasmaarme *Alveolen-Zellen* mit teils rundlichen, teils unregel-

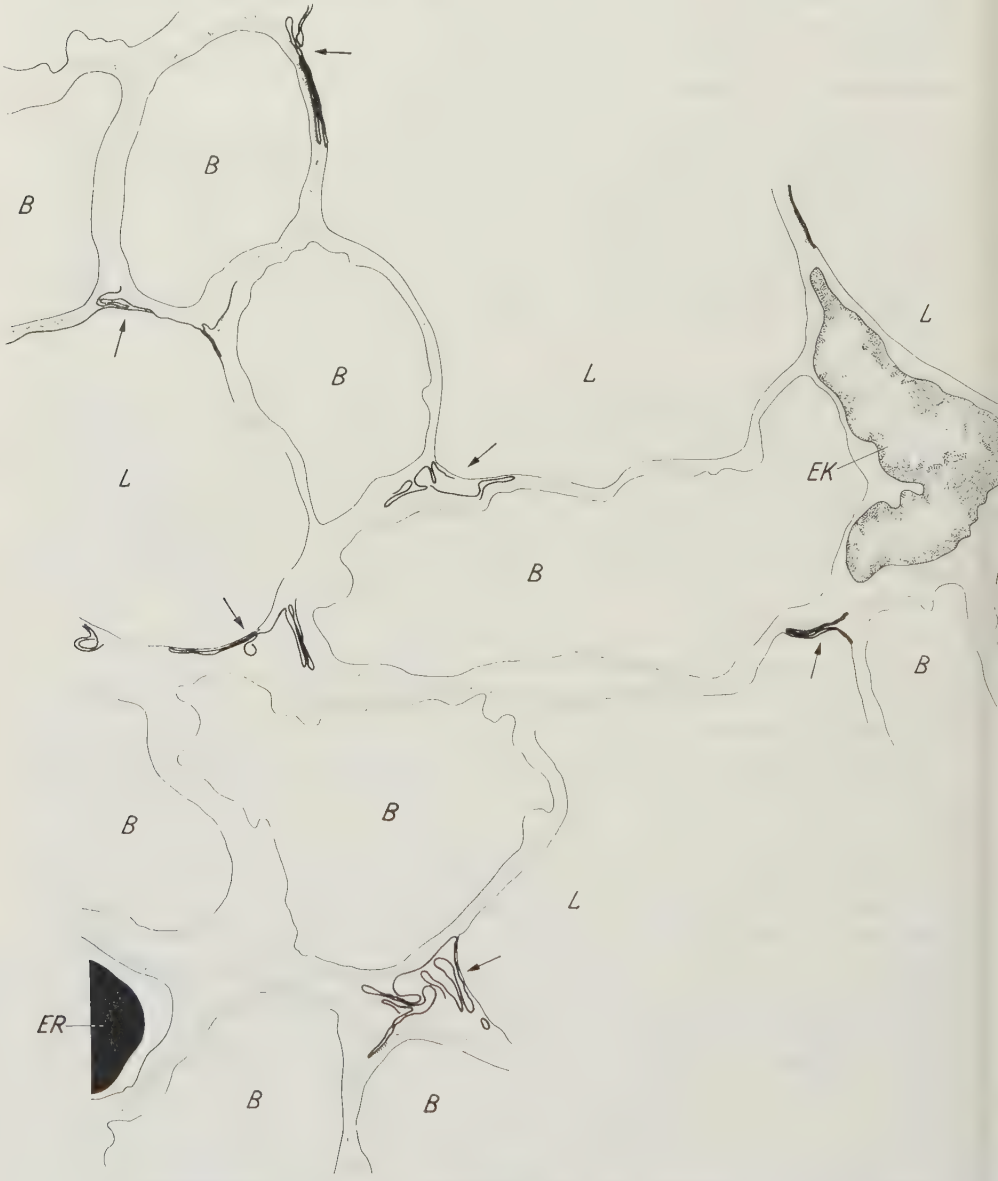


Abb. 1. Halbschematische, aus einer Photomontage gewonnene Darstellung des Lungengewebes der Taube mit Membrankonvoluten (Pfeile) bei etwa 3000facher Vergrößerung. *B* Blutkapillare, *Er* Erythrozyt, *L* Luftkapillare, *EK* Endothelkern, Basalmembran: punktiert. Ein kernhaltiger Abschnitt einer Lungendeckzelle ist nicht getroffen

mäßig geformten Kernen an, die sich durch dichte randständige Chromatinmassen auszeichnen. Manche dieser Alveolardeckzellen enthalten in Kernnähe gelegene

massendichte Einschlüsse von körniger Struktur und optisch leere Vacuolen. Die Mitochondrien der Alveolardeckzellen sind rundlich geformt und gehören dem Cristatypus an.

Die Wände der *Luftkapillaren* unterscheiden sich von denen der Lungenalveolen der Säuger zunächst in folgendem Punkte: Sie sind völlig glatt konturiert, d. h. man erkennt bei schwächerer Vergrößerung des Cytoplasmabelags auf der Luftseite der Blutkapillaren keine mehr oder weniger stark ausgeprägten Erhabenheiten. Man gewinnt in der Tat den Eindruck (Schulz 1959), im Bereich der Luftkapillaren grenze die nackte Basalmembran der Blutkapillaren unmittelbar an die Atemluft. Bei Anwendung stärkerer Vergrößerung kann man indessen feststellen, daß die Luftkapillaren offenbar von einer überaus zarten, scharflinig

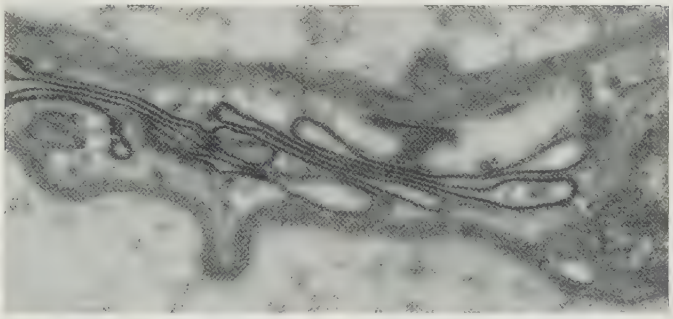
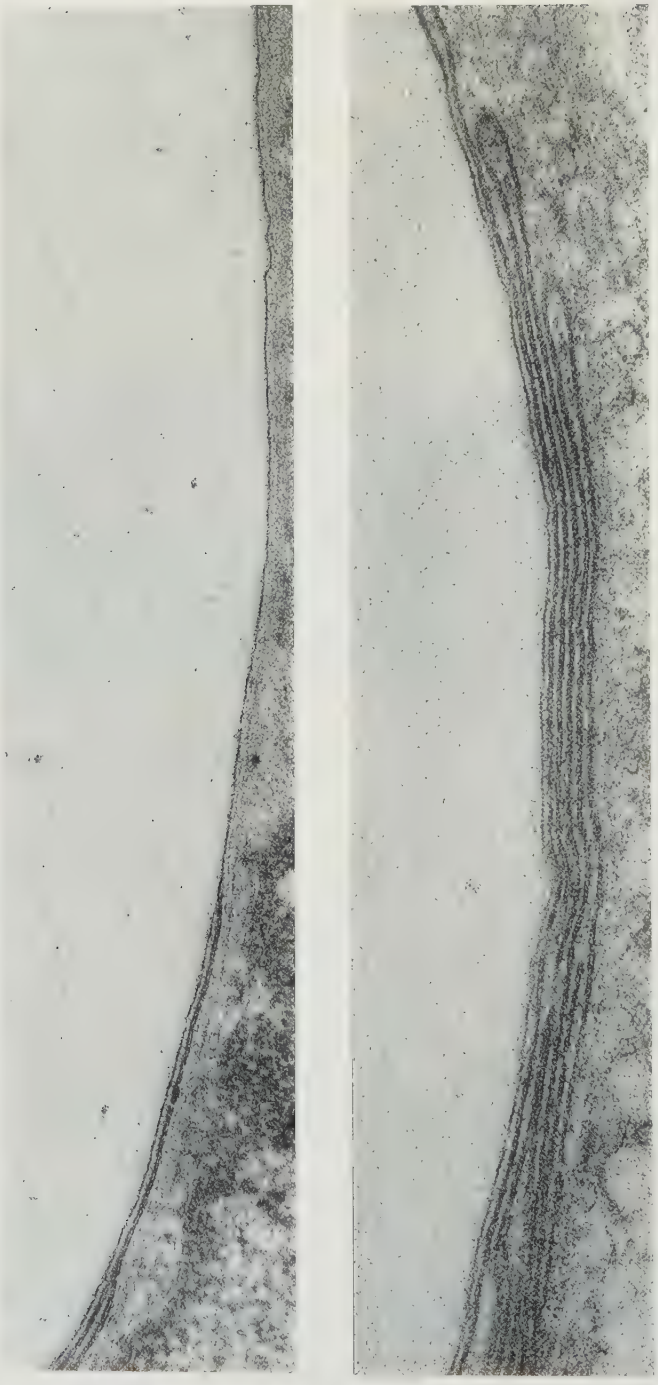


Abb. 2. Interkapilläres Membrankonvolut. Vergr. 20000fach

konturierten Membran begrenzt werden, die sich bei mangelhafter Fixierung des Untersuchungsgutes stellenweise von der Unterlage, d. h. von der Oberfläche der Blutkapillaren, abhebt.

Eine weitere, höchst bemerkenswerte Tatsache beruht in der Existenz scharf konturierter, stark gewundener und gefalteter *Komplexe von dünnen, massendichten Membranen*, die auf Übersichtsaufnahmen durch ihre Lokalisation in Kapillarnischen und engen Bezirken zwischen den Blutkapillaren auffallen. Abb. 1 gibt eine nach einer Photomontage gewonnene Situationsskizze derartiger Membrankomplexe wieder. Bei höherer Auflösung stellt sich heraus, daß sich diese Komplexe aus Doppelmembranen aufbauen.

Über die Natur der geschilderten *Membrankonvolute* (Abb. 2) ist Aufschluß zu gewinnen, wenn man die Auskleidung der Luftkapillaren und ihre Beziehungen zu den Nischenzellen genauer untersucht. Man kann feststellen, daß sich das der Atemluft zugewandte Plasmalemm dieser Zellen stellenweise — dies fraglos aus nicht übersehbaren methodischen Gründen — in gleicher Prägnanz wie die erwähnten Membranen darstellt, sofern die Schnitte mit Kaliumpermanganat behandelt wurden. Weiterhin kann man dieses Plasmalemm mancherorts bis zu Umschlagsfalten verfolgen, d. h. man erkennt mit den interkapillären Doppelmembranen übereinstimmende Formationen auch in der Auskleidung der Luftkapillaren. Nicht selten kommt es hier zur Übereinanderschichtung sehr zarter Cytoplasmalamellen von weithin gleichbleibender Stärke, die miteinander verfalzt sind. In Abb. 3 ist eine Lage derartiger Lamellen wiedergegeben, die eine durchschnittliche



a b

Abb. 3 a u. b. Membranauskleidung von Luftkapillaren, rechts mit mehrfacher Schichtung. Vergrößerung 60000 (a) bzw. 70000fach (b)

Dicke von 200 Å besitzen. In den Nischenbereichen senken sich diese Lamellen in die Tiefe. Dabei nehmen die Cytoplasmablätter welligen und gewundenen Verlauf; auf diese Weise kommt das Bild der oben erwähnten Membrankonvolute zustande. Außerhalb des Bereiches der Nischen und der Deckzellperikaryen sinkt die Stärke der aus Endothel, Basalmembran und Auskleidung der Luftkapillaren bestehenden Atmungsmembran bis zu dem Wert von 700 Å ab. Insgesamt ergibt sich somit die Feststellung, daß die den Alveolarpithelzellen entsprechenden Elemente der Vogellunge die Blutkapillaren mit ungemein zarten, von den Perikaryen der Lungendeckzellen ausgehenden Cytoplasmaplatten überziehen, die sich streckenweise überschichten. Im Bereich der Konvolute liegen offenbar die Orte einer besonders innigen Verschränkung der peripheren Zellabschnitte vor.

Die auf lichtmikroskopische Beobachtungen gegründete Auffassung von der mesenchymalen Abkunft der Deckzellen in der Vogellunge, die sich wie Epithelzellen verhalten (s. o.), dürfte nicht mehr aufrecht zu erhalten sein, doch sind erneute Untersuchungen der Histogenese des Organs notwendig.

Zusammenfassung

Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergeben, daß nicht nur die respiratorische Oberfläche der *Reptilienlunge*, sondern auch der Lunge der *Vögel* jene Dreischichtung aufweist, wie sie für die Atmungsfläche der Amphibien- und Säugerlunge bereits nachgewiesen wurde: Sie gliedert sich in Endothel, Basalmembran und einschichtiges Epithel. Allerdings liegen in der Vogellunge insofern besondere Verhältnisse vor, als das Cytoplasma der Deckzellen in den Luftkapillaren zu sehr dünnen Platten ausgezogen ist, die sich stellenweise ziemlich regelmäßig übereinander schichten und in den Nischen zwischen den Blutkapillaren auffällige Membrankonvolute bilden. Mit dieser Feststellung ergibt sich, daß weder die eingangs erwähnte, die Vogellunge betreffende Darstellung von Schulz (1959) noch jene von Salt und Zeuthen (1960) den tatsächlichen Verhältnissen gerecht wird.

Die ältere Ansicht (Bargmann 1935, 1936), wonach die Vogellunge als ein intensiver Beatmung in höchstem Maße angepaßtes Organ am Ende einer funktionellen Reihe steht, erweist sich zwar insofern als unzutreffend, als ihre Blutkapillaren nicht weitgehend nackt an die Atemluft angrenzen. Sie kann jedoch deswegen noch Geltung beanspruchen, weil die Cytoplasmaauskleidung ihrer Luftkapillaren auf große Strecken hin wesentlich dünner als die Epithelauskleidung der Lungenalveolen der Säugetiere ist.

Literatur

Bargmann, W.: Zur vergleichenden Histologie der Lungenalveole. Z. Zellforsch. **23**, 335—360 (1935).

— Die Lungenalveole. In Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen, herausgeg. von W. v. Möllendorff, Bd. V/3. Berlin: Springer 1936.

—, u. A. Knoop: Vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen der Lungenkapillaren. Z. Zellforsch. **44**, 263—281 (1956).

Ogawa, C.: Contributions to the histology of the respiratory spaces of the vertebrate lungs. Amer. J. Anat. **27**, 33 (1920).

Rothley, H.: Über den feineren Bau der Luftröhre und der Lunge der Reptilien. Z. Morph. u. Ökol. Tiere **20**, 1—62 (1930).

Salt, G. W., and E. Zeuthen: The respiratory system. In: Biology and Comparative Physiology of Birds, Vol. I, ed. by A. J. Marshall. Academic Press, New York and London (1960).

Schulz, H.: Die submikroskopische Anatomie und Pathologie der Lunge. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959.

Stanislaus, M.: Untersuchungen an der Kolibrilunge. Z. Morphol. u. Ökol. Tiere **33**, 261—289 (1937).

Thiel, A.: Licht- und elektronenmikroskopische Studien über das Nierenkörperchen der Griechischen Landschildkröte (Testudo graeca L.). Z. Zellforsch. **47**, 288—391 (1957/58).

Weslaw, W.: Contribution à l'histophysiologie et l'histopathologie de l'épithélium pulmonaire des vertébrés. Poznán 1934.

Professor Dr. W. Bargmann, Anatomisches Institut der Universität Kiel
Neue Universität, Eingang F 1

Aufnahmebedingungen

I. Sachliche Anforderungen

1. Der Inhalt der Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören.

2. Die Arbeit muß wissenschaftlich wertvoll sein und Neues bringen. Bloße Bestätigungen bereits anerkannter Befunde können, wenn überhaupt, nur in kürzester Form aufgenommen werden. Dasselbe gilt von Versuchen und Beobachtungen, die ein positives Resultat nicht ergeben haben. Arbeiten, rein referierenden Inhalts werden abgelehnt, vorläufige Mitteilungen nur ausnahmsweise aufgenommen. Polemiken sind zu vermeiden, kurze Richtigstellung der Tatbestände ist zulässig. Aufsätze spekulativen Inhalts sind nur dann geeignet, wenn sie durch neue Gesichtspunkte die Forschung anregen.

II. Formelle Anforderungen

1. Das Manuskript muß leicht leserlich (möglichst in Maschinenschrift) geschrieben sein. Die Abbildungsvorlagen sind auf besonderen Blättern beizufügen. Diktierte Arbeiten bedürfen der stilistischen Durcharbeitung zwecks Vermeidung von weitschweifiger und unsorgfältiger Darstellung. Absätze sind nur zulässig, wenn mit ihnen ein neuer Gedankengang beginnt.

2. Die Arbeiten müssen *kurz* und stilistisch einwandfrei geschrieben sein. Ausführliche historische Einleitungen sind zu vermeiden. Die Fragestellung kann durch wenige Sätze klargelegt werden. Der Anschluß an frühere Behandlungen des Themas ist durch Hinweis auf die letzten Literaturzusammenstellungen (in Monographien, „Ergebnissen", Handbüchern) herzustellen.

3. Der Weg, auf dem die Resultate gewonnen wurden, muß klar erkennbar sein; jedoch hat eine ausführliche Darstellung der Methodik nur dann Wert, wenn sie wesentlich Neues enthält.

4. Jeder Arbeit ist eine kurze Zusammenfassung (höchstens 1 Seite) der wesentlichen Ergebnisse anzufügen, die in einer der Kongreßsprachen abgefaßt sein kann.

5. Von jeder Versuchsart bzw. jedem Tatsachenbestand ist in der Regel nur *ein* Protokoll im Telegrammstil als Beispiel in knappster Form mitzuteilen. Das übrige Beweismaterial kann im Text oder, wenn dies nicht zu umgehen ist, in Tabellenform gebracht werden; dabei müssen aber umfangreiche tabellarische Zusammenstellungen unbedingt vermieden werden. Es wird empfohlen, durch eine Fußnote daraufhinzuweisen, in welchem Institut das gesamte Beweismaterial eingesehen oder angefordert werden kann.

6. Die *Abbildungen* sind auf das unbedingt Notwendige zu beschränken. Kurven, Diagramme usw., die nur zur Illustration von Befunden dienen und ohne weiteres im Text beschrieben werden können, werden zurückgewiesen. Knappe, klare Abbildungsunterschriften (Legenden) erübrigen nochmalige Beschreibung im Text. Sie sind getrennt von den Abbildungen dem Manuskript im Anschluß an das Literaturverzeichnis beizufügen. Unzulässig ist die *doppelte* Darstellung in Abbildung *und* Kurve. Bereits veröffentlichte Abbildungen können nicht wiederholt werden. Ausnahmen hiervon sind nur in besonders begründeten Fällen möglich. *Farbige* Bilder können in der Regel keine Aufnahme finden. Für Kurven oder Schwarzweißzeichnungen, die als Strichätzung reproduziert werden können, genügt die Ablieferung sauberer, klarer Skizzen, die vom Verlag umgezeichnet werden. Bei Halbtonbildern (Photos, Mikrophotos, Halbtonzeichnungen) sind saubere, scharfe und tonwertreiche Originalvorlagen (Hochglanzabzüge von Originalphotographien) notwendig. Besondere Wünsche des Autors hinsichtlich des linearen Verkleinerungs- und Vergrößerungsmaßstabes der Vorlagen sollen vermerkt werden.

Die *Beschriftung* der Abbildungen mit Buchstaben oder Ziffern erfolgt durch den Verlag. Die Hinweise hierfür sollen keinesfalls in der Abbildung selbst, sondern auf einem darüberliegenden transparenten Deckblatt angegeben werden. Dort sind auch Abstriche oder gewünschte Bildausschnitte zu bezeichnen. Hinweispfeile oder -linien sind ebenfalls auf dem Deckblatt anzubringen, wobei die Endpunkte durch Einstich mit einer feinen Nadel auf der darunterliegenden Originalvorlage fixiert werden sollen. Es empfiehlt sich ferner, auf dem Deckblatt wichtige Abbildungspartien zu kennzeichnen, damit die Kunstanstalt bei der Ätzung ihr besonderes Augenmerk darauf richten kann.

7. Literaturangaben sollen Autorennamen, vollständigen Titel der Arbeit, Zeitschrift, Band- und Seitenzahl sowie Jahreszahl umfassen [z.B. Böke, W.: Untersuchungen des Linsenepithels mit dem Phasenkontrastmikroskop. Z. Zellforsch. 38, 428—454 (1953)]. Die Literaturangaben sind am Schluß der Arbeit nach den Autorennamen alphabetisch anzuordnen und nicht zu numerieren. Werden mehrere Arbeiten des gleichen Autors zitiert, so ist an der betreffenden Stelle im Text eine in Klammern gesetzte 1, 2 bzw. 3 hinter dem Autorennamen einzufügen. Im Literaturverzeichnis steht diese Zahl, ebenfalls in Klammern gesetzt, vor der betreffenden Arbeit. Bücher müssen mit vollem Titel, Auflage, Ort, Verlag und Jahr zitiert werden.

8. Methodik, Protokolle und weniger wichtige Teile des Textes sind für *Kleindruck* vorzumerken. Die Lesbarkeit des Wesentlichen wird hierdurch gehoben.

9. Doppeltitel sind aus bibliographischen Gründen unerwünscht. Das gilt insbesondere, wenn die Autoren in Ober- und Untertitel einer Arbeit nicht die gleichen sind.

10. An *Dissertationen*, soweit deren Aufnahme überhaupt zulässig erscheint, werden nach Form und Inhalt dieselben Anforderungen gestellt wie an andere Arbeiten. Danksagungen an Institutsleiter, Dozenten usw. werden nicht abgedruckt. Zulässig sind einzeilige Fußnoten mit der Mitteilung, wer die Arbeit angeregt und geleitet oder wer die Mittel dazu gegeben hat. *Festschriften* und *Monographien* gehören nicht in den Rahmen einer Zeitschrift.

Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie und Histologie

Begründet von
O. Lubarsch† und F. Henke†, fortgeführt von R. Rössle†
Herausgegeben von E. Uehlinger, Zürich

Erster Band

Blut · Knochenmark · Lymphknoten · Milz

in drei Teilen

Dritter Teil

Lymphknoten

Diagnostik in Schnitt und Ausstrich

In zwei Bandteilen

Vor kurzem erschien:

Bandteil A

Cytologie und Lymphadenitis

Von Dr. Karl Lennert,
Professor am Pathologischen Institut der Universität Heidelberg

Mit 316 zum Teil farbigen Abbildungen in 551 Einzeldarstellungen. XVI, 605 Seiten Gr.-8°.
1961.
DM 296,—; Ganzleinen DM 305,—

ZUR INFORMATION

In den letzten Jahrzehnten wurde die Lymphknotencytologie in Ausstrichuntersuchungen, in cytochemischen, karyometrischen, phasenoptischen und elektronenmikroskopischen Studien eingehend bearbeitet. Eine Integration der zahlreichen Einzelbefunde und vor allem eine Abstimmung der Cytologie von Schnitt und Ausstrich steht noch aus. Darunter leidet insbesondere die Verständigung zwischen dem Kliniker und Pathologen. Der Verfasser versucht daher, an einem großen eigenen Untersuchungsgut von Schnitten und Ausstrichen die divergenten Zellsysteme der Literatur zu „eichen" und durch Angabe der Synonyma untereinander vergleichbar zu machen. Eine große Anzahl instruktiver Abbildungen ermöglicht dem diagnostisch tätigen Kliniker und Pathologen eine rasche Orientierung über die verschiedenen Lymphadenitisformen.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany